

**Zelltyp-spezifische Inaktivierung von *Mct8* in Gehirnzellen:
in vivo und *in vitro* Analysen des Gehirnstoffwechsels**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Master of Science Franziska Meyer

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen

1. Prof. Dr. Werner Kloas
2. Prof. Dr. Ulrich Schweizer
3. Prof. Dr. Klaudia Brix

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2016

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ZUSAMMENFASSUNG	IX
ABSTRACT	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Schilddrüsenhormone	1
1.1.1 Aufbau der Schilddrüse	3
1.1.2 Schilddrüsenhormonbiosynthese	4
1.2 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse (HPT-Achse).....	5
1.3 Schilddrüsenhormontransporter	6
1.3.1 Der Monocarboxylattransporter 8 (MCT8).....	7
1.3.2 Das Allan-Herndon-Dudley Syndrom	8
1.3.3 <i>Mct8</i> -defiziente Mausmodelle mit Fokus auf den Gehirn-Phänotyp.....	9
1.4 Schilddrüsenhormone während der Entwicklung.....	11
1.4.1 Schilddrüsenhormone während der Gehirnentwicklung	12
1.4.2 Schilddrüsenhormoneinfluss auf Thermogenese und Energiestoffwechsel	13
1.5 Energiestoffwechsel im Gehirn	14
1.6 Zielsetzung der Arbeit	18
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	20
2.1 Geräte	20
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.2.1 Chemikalien und Reagenzien	21
2.2.2 Vorgefertigte Reagenziensysteme	21
2.2.3 Oligonukleotide	21
2.2.4 Antikörper	22
2.3 Software und Datenbanken.....	22
2.4 Mauslinien, Mauszucht und Maushaltung.....	23
2.5 Rotarod	24
2.6 Gewinnung von murinem Probenmaterial.....	25
2.7 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.7.1 Isolation genomischer DNA zur Genotypisierung verschiedener Mauslinien	25
2.7.2 RNA Isolierung	26
2.7.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	27
2.7.4 Reverse Transkription von RNA zu cDNA.....	27

2.7.5	Quantitative Real Time PCR (qPCR).....	27
2.8	Zellbiologische Methoden.....	28
2.8.1	Isolierung und Kultivierung primärer Astrozytenkulturen.....	28
2.8.2	Isolierung und Kultivierung primärer kortikaler Neuronkulturen.....	30
2.9	Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.9.1	Proteinextraktion.....	33
2.9.2	Proteinbestimmung mittels Bradford und BCA.....	33
2.9.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.9.4	Western Blot und Immundetektion.....	35
2.10	Histologische Methoden.....	35
2.10.1	Nissl-Färbung kryoprotektierter Gehirnschnitte.....	36
2.10.2	Peroxidase-Färbung von <i>free floating</i> Gehirnschnitten.....	36
2.10.3	Fluoreszenz-Färbung von Zellen und Gehirnschnitten.....	37
2.11	Funktionelle Analysen.....	38
2.11.1	Messung des mitochondrialen Energiestoffwechsels mittels <i>Seahorse XF^e Technologie</i>	38
2.11.2	T3/T4 Radioimmunassay.....	40
2.11.3	Radioaktive T3-Aufnahme in primären Zellen.....	41
2.11.4	Dejodase-Aktivitätsmessung.....	41
2.11.5	Citratsynthase-Assay.....	44
2.11.6	Laktatdehydrogenase-Aktivitätsmessung.....	45
2.11.7	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS)..	46
2.11.8	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i> , NMR).....	47
2.12	Statistik.....	48
3	ERGEBNISSE.....	49
3.1	Phänotypische Charakterisierung der transgenen Mauslinie <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}</i>	49
3.1.1	Charakterisierung äußerer Merkmale.....	50
3.1.2	Charakterisierung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse (HPT-Achse)	51
3.1.3	Charakterisierung peripherer Organe.....	52
3.2	Gehirn-Phänotyp von <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}</i> -Mäusen.....	53
3.2.1	Analyse neuronaler Marker.....	53
3.2.2	Analyse von Schilddrüsenhormon-regulierten Genen mittels qPCR.....	55
3.2.3	Analyse des zerebralen Energiestoffwechsels mittels NMR <i>in vivo</i>	56
3.3	Analyse des Energiestoffwechsels in primären <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten <i>in vitro</i>	61
3.3.1	Charakterisierung <i>Mct8</i> -defizienter Astrozyten.....	62
3.3.2	Analyse des Energiestoffwechsels mittels <i>Seahorse XF^e Flux Analyzer</i> in <i>Mct8</i> - defizienten Astrozyten.....	63
3.3.3	Analyse der Citratsynthase-Aktivität in <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten.....	66

3.3.4	Analyse der Expression OXPHOS-relevanter Gene in <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten...	67
3.4	Analyse des Energiestoffwechsels in primären <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen <i>in vitro</i>	69
3.4.1	Charakterisierung <i>Mct8</i> -defizienter Neurone	69
3.4.2	Analyse des Energiestoffwechsels mittels <i>Seahorse XF^e Flux Analyzer</i> in <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen.....	72
3.4.3	Analyse der Citratsynthase-Aktivität in <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen.....	76
3.4.4	Analyse der Expression OXPHOS-relevanter Gene in <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen	76
4	DISKUSSION	79
4.1	Das Neuron-spezifische <i>Mct8</i> -defiziente Mausmodell im Vergleich zum globalen <i>Mct8</i> -defizienten Mausmodell	80
4.2	Gehirnphänotyp Neuron-spezifischer <i>Mct8</i> -defizienter Mäuse im Vergleich zum globalen <i>Mct8</i> -defizienten Mausmodell.....	82
4.3	Zerebraler Energiestoffwechsel im neuronalen <i>Mct8</i> -defizienten Mausmodell <i>in vivo</i>	85
4.4	Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf den Energiestoffwechsel <i>Mct8</i> -defizienter Gehirnzellen <i>in vitro</i>	91
4.4.1	Energiestoffwechsel <i>Mct8</i> -defizienter Astrozyten	92
4.4.2	Energiestoffwechsel <i>Mct8</i> -defizienter Neurone	95
5	ANHANG.....	100
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	103
	PUBLIKATIONEN.....	114
	DANKSAGUNG.....	115
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	116

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung Schilddrüsenhormon-vermittelter Transkriptionsaktivitäten.....	2
Abbildung 2: Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen.....	3
Abbildung 3: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse.....	5
Abbildung 4: Schilddrüsenhormontransport im murinen Gehirn.....	13
Abbildung 5: Der Glutamin-Glutamat-GABA Zyklus zwischen Astrozyten und Neuronen ..	16
Abbildung 6: Die Astrozyten-Neuron-Laktat Shuttle Hypothese (ANLSH).	17
Abbildung 7: Übersicht des zerebralen Metabolismus im Neuron und Astrozyten nach Infusion von (1- ¹³ C) markierter Glukose bzw. (2- ¹³ C) markiertem Acetat.....	18
Abbildung 8: Vektorkarte „ <i>Mct8</i> Knock-out first allele“ (promotor driven) und Genotypisierung <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}</i> -Mäuse.	24
Abbildung 9: Messprinzip im <i>Seahorse XF^e Flux Analyzer</i> und mitochondriales Stress Test Profil.....	38
Abbildung 10: <i>Mct8</i> -Expression in <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> - und globalen <i>Mct8</i> -defizienten Mäusen.	50
Abbildung 11: Phänotypische Charakterisierung von adulten <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> - und <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}</i> -Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern.	51
Abbildung 12: Charakterisierung der HPT-Achse in <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> - und <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}</i> -Mäusen im Alter von drei Monaten.....	52
Abbildung 13: Rotarod-Test mit <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> - und <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}</i> -Mäusen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern.....	52
Abbildung 14: Messung der Leber Dehydrogenase 1-Aktivität in <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> - und <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}</i> -Mäusen.....	53
Abbildung 15: Immunhistochemische Färbungen im somatosensorischen Cortex (<i>barrel field</i>) auf Wildtyp- und <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> -Gehirnschnitten.	54
Abbildung 16: Genexpressionsanalysen in <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> - und <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}</i> - sowie globalen <i>Mct8</i> -defizienten Mäusen.	56
Abbildung 17: <i>In vivo</i> ¹ H NMR-Analysen in Cortex und Striatum von <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> -Mäusen	57
Abbildung 18: Darstellung der Verstoffwechselung von (1- ¹³ C) Glukose und deren ¹³ C-Einbau in Metabolite der Glykolyse, dem Citratzyklus (TCA Zyklus) und Neurotransmittern	58
Abbildung 19: ¹³ C NMR Analysen nach Infusion von (1- ¹³ C) markierter Glukose in Cortex und Striatum von <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> -Mäusen.....	59

Abbildung 20: Messung der Ldh-Aktivität in Cortex und Striatum von <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> -Mäusen	60
Abbildung 21: Genexpressionsanalysen im Cortex von <i>CamK-Cre;Mct8^{fl/y}</i> -Mäusen deuten auf einen veränderten Glukosemetabolismus und Glutamin-Glutamat-GABA Zyklus hin.....	61
Abbildung 22: Immunhistochemische Antikörper-Färbungen in primären Wildtyp-Astrozyten (DIV7)	62
Abbildung 23: Expression verschiedener Schilddrüsenhormon-Transporter und –Rezeptoren in primären Wildtyp und <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten	63
Abbildung 24: Wichtige Parameter der mitochondrialen Atmung in Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten.....	64
Abbildung 25: Mitochondriale OXPHOS-Kapazität in primären Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten	66
Abbildung 26: Messung der Citratsynthase-Aktivität in Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten	67
Abbildung 27: Proteinexpression wichtiger Komponenten der einzelnen OXPHOS-Komplexe in Wildtyp und <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten.....	69
Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Färbung neuronaler Marker (Tau, NeuN) und <i>Mct8</i> auf Wildtyp-Neurone (DIV7).....	70
Abbildung 29: Expression verschiedener Schilddrüsenhormon-Transporter und –Rezeptoren in primären Wildtyp und <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen	70
Abbildung 30: Expressionsnachweis T3-regulierter Gene in Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen	72
Abbildung 31: Wichtige Parameter der mitochondrialen Atmung in Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen	74
Abbildung 32: Mitochondriale OXPHOS-Kapazität in primären Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen	76
Abbildung 33: Messung der Citratsynthase-Aktivität in Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen	76
Abbildung 34: Proteinexpression wichtiger Komponenten der einzelnen OXPHOS-Komplexe in Wildtyp und <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen.....	78

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten humanen und murinen Schilddrüsenhormontransporter und deren Expressionsmuster im Gehirn	6
Tabelle 2: Zusammenfassung aller verwendeten Antikörper.....	22
Tabelle 3: Zusammenfassung aller verwendeten Software und Datenbanken.....	22
Tabelle 4: Ansatz für eine Genotypisierungs-PCR Reaktion der <i>Mct8^{fl/fl}</i> -Mauslinie	26
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Genotypisierungsprimer.....	26
Tabelle 6: Ansatz für Erststrangsynthese von cDNA aus RNA.....	27
Tabelle 7: Ansatz für eine quantitative Real-Time PCR.....	28
Tabelle 8: Zusammensetzung Zellkulturmedien für primäre Astrozytenkulturen	29
Tabelle 9: Zusammensetzung Zellkulturmedien für primäre kortikale Neuronkulturen	31
Tabelle 10: Zusammenfassung Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.....	32
Tabelle 11: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für eine SDS-PAGE	34
Tabelle 12: Zusammenstellung Puffer und Lösungen für histologische Methoden.....	35
Tabelle 13: Zusammenfassung verwendeter Inhibitoren/Entkoppler und deren spezifischer Wirkungsmechanismus innerhalb der mitochondrialen Atmungskette	39
Tabelle 14: Übersicht der Berechnung wichtiger Funktionen nach einem mitochondrialen Stresstest in primären murinen Zellen.....	40
Tabelle 15: Zusammensetzung Puffer und Lösungen für einen radioaktiven Dejodase-Aktivitätsassay	42
Tabelle 16: Zusammensetzung Puffer und Lösungen für einen Citratsynthase-Assay.....	45
Tabelle 17: Zusammensetzung Puffer und Lösungen für einen Laktatdehydrogenase-Aktivitätsassay	46
Tabelle 18: Zusammenfassung wichtiger Parameter der mitochondrialen Atmung in Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten	65
Tabelle 19: Relative Expression OXPHOS-relevanter Gene in Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Astrozyten	68
Tabelle 20: Zusammenfassung wichtiger Parameter der mitochondrialen Atmung in Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen.....	75
Tabelle 21: Relative Expression OXPHOS-relevanter Gene in Wildtyp- und <i>Mct8</i> -defizienten Neuronen	77
Tabelle 22: Übersicht aller verwendeten Primer für qPCR-Analysen	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
18SrRNA	18S Untereinheit ribosomaler RNA
AHDS	Allan-Herndon-Dudley Syndrom
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CS-Aktivität	Citratsynthase-Aktivität
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Dio1/2/3	Deiodase 1/2/3
DIV7	<i>days in vitro</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E14	Embryonaltag 14
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
Fwd	<i>forward</i>
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
HPT-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse
kDa	Kilo-Dalton
KO	<i>knockout</i>
Lac	Laktat
Lat	L-type amino acid transporter
LC-MS/MS	Liquid Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
M	Molar
Mct	Monocarboxylattransporter
min	Minute
ml	Milliliter
nM	Nanomolar

NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i>)
OCR	<i>oxygen consumption rate</i>
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PLL	Poly-L-Lysin
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
rev	<i>reverse</i>
SDH	Schilddrüsenhormon
sec	Sekunde
T3	3,3',5-Triiod-L-thyronin
T4	3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin
TCA	Citratzyklus
TR α/β	Schilddrüsenhormonrezeptor α/β
Trh	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
Tsh	Thyreoida-stimulierendes Hormon
w/o TH	<i>without thyroid hormone</i>
WT	Wildtyp

ZUSAMMENFASSUNG

Der Monocarboxylattransporter 8 (Mct8) ist ein spezifischer Schilddrüsenhormon (SDH)-Transporter. MCT8-Mutationen führen zu einer psychomotorischen Retardierung in Kombination mit abnormalen SDH-Serumkonzentrationen. Das konstitutiv *Mct8*-defiziente Mausmodell repliziert den endokrinologischen, jedoch nicht den humanen neurologischen Phänotyp. Um die Hypothese eines stark beeinträchtigten T3-Transportes speziell in Neuronen als Ursache zu untersuchen, wurde das Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente Mausmodell (*CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*) generiert. Neben einer funktionalen, *Mct8*-exprimierenden Blut-Hirn-Schranke liegt eine funktionale Hypophysen-Hypothalamus-Schilddrüsen Achse vor. NMR-Analysen des zerebralen Energiestoffwechsels von *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen zeigen nach [1-¹³C] Glukoseinfusion verringerte Laktatintensitäten sowie eine reduzierte Laktatdehydrogenase-Aktivität. Zudem sind Astrozyten-spezifische Transporter und Enzyme des Neurotransmitterstoffwechsels und deren Biosynthese in ihrer Genexpression reduziert. Somit führt der neuronale *Mct8*-Verlust zu einem verlangsamten zerebralen Metabolismus sowie einer reduzierten neuronalen Aktivität.

Die Rolle von *Mct8* im Energiestoffwechsel wurde außerdem in primären *Mct8*-defizienten Astrozyten- und Neuronkulturen mittels *Seahorse Flux Analyzer* untersucht. In *Mct8*-defizienten Neuronen kommt es zu einer verringerten SDH-Aufnahme, was in einer verringerten Expression von OXPHOS-relevanten Proteinen sowie in einer verringerten Sauerstoffverbrauchsrate resultiert. Somit stützen die *in vitro* Daten die des *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mausmodells bezüglich einer reduzierten neuronalen Aktivität sowie eines verlangsamten zerebralen Stoffwechsels.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass grundlegende Mechanismen des zerebralen Stoffwechsels bei neuronaler *Mct8*-Defizienz beeinträchtigt sind und die Rolle von *Mct8* mit Hilfe weiterer konditioneller Mausmodelle (Astrozyten-spezifisch) und primären Ko-Kulturmodellen untersucht werden muss.

Schlagwörter: Schilddrüsenhormon, Monocarboxylattransporter 8, Neuron, Astrozyt, Energiestoffwechsel, NMR

ABSTRACT

The monocarboxylate transporter 8 (Mct8) is the most specific thyroid hormone (TH) transporter. Mutations lead to a severe form of psychomotor retardation in combination with abnormal TH concentrations in sera. The global *Mct8*-deficient mouse model was intensively studied and it replicates the endocrine, but not the human neurological phenotype. To test the hypothesis, that a disturbed uptake of T3 especially into neurons is responsible for the phenotype, we generated a neuron-specific *Mct8*-deficient mouse model (*CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*). *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}* mice exhibit a functional *Mct8*-expressing blood-brain-barrier and a functional hypothalamus pituitary thyroid axis. NMR analyses of the cerebral energy metabolism of *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}* mice after [1-¹³C] glucose injection revealed less enrichment of lactate and a reduced lactate dehydrogenase activity. Moreover, especially astrocyte-specific expressed transporter and enzymes of neurotransmitter metabolism and their biosynthesis are significantly reduced in comparison to control mice. These results point to a decelerated cerebral metabolism as well as a reduced neuronal activity caused by the neuronal loss of *Mct8*. In addition, we studied the impact of *Mct8* on the energy metabolism in primary wildtype and *Mct8*-deficient astrocyte and neuron cultures by use of the *Seahorse Flux Analyzer*. *Mct8*-deficient neurons show a reduced uptake of TH, which results in a reduced expression of OXPHOS relevant proteins as well as a reduced oxygen consumption rate. Therefore, the *in vitro* raised data provide the observed changes of the *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}* mice regarding a reduced synaptic activity as well as a reduced cerebral metabolism.

Taken together, the data clearly shows that basic mechanisms of the cerebral metabolism are hampered in neuronal *Mct8* deficiency. The role of *Mct8* in this context needs further analyses with the help of conditional mouse models (astrocyte-specific) and primary co-culture models.

Key words: thyroid hormone, monocarboxylate transporter 8 (Mct8), neuron, astrocyte, energy metabolism, NMR

1 EINLEITUNG

1.1 Schilddrüsenhormone

Vor mehr als 100 Jahren gelang es dem amerikanischen Biochemiker Edward Calvin Kendall Thyroxin aus Schilddrüsengewebe zu extrahieren und dieses zu kristallisieren sowie seine aktive Wirkung an Hunden und Menschen mit Hypothyreose nachzuweisen (Kendall 1964). Nur wenige Jahre später gelang es Charles Robert Harington, aufbauend auf Kendalls Arbeit, Thyroxin aus Dijodtyrosin synthetisch herzustellen. Er trug somit zu dessen Strukturaufklärung maßgebend bei (Harington et al. 1927).

Schilddrüsenhormone (SDH) werden in den Thyreozyten der Schilddrüse gebildet und in den Blutkreislauf sezerniert, wo sie organspezifisch in geringen Mengen wirken und so den Energiestoffwechsel, die Zelldifferenzierung und die Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) regulieren. Zu den klassischen Hormonen zählen Thyroxin (3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin, T₄), Trijodthyronin (3,3',5-Triiod-L-thyronin, T₃) und reverses Trijodthyronin (3,3',5'-Triiod-L-thyronin, rT₃). Im Blutkreislauf liegen T₄ und T₃ zu > 99,5% in an Transportproteine gebundener, inaktiver Form vor. Zu den Bindeproteinen gehören Thyroxin-bindendes Globulin (TBG), Transthyretin (TTR) und Albumin, alle mit unterschiedlichen Affinitäten und Bindungskapazitäten (Schweizer et al. 2013). Diese Proteine verhindern zum einen, dass die hydrophoben Hormone nicht unspezifisch an Lipidmembranen binden, sondern erst in den Zielorganen wirken. Zum anderen erhöhen sie die SDH-Reserve im Blut, indem ihr Abbau unterbunden wird.

Die SDH-Aktivität wird durch die Bindung des biologisch aktiven Metaboliten T₃ an einen nukleären Schilddrüsenhormonrezeptor α oder β (TR α oder TR β) vermittelt. Hierbei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, welche an spezifische Stellen der DNA binden, sog. *thyroid hormone response elements* (TRE), und so durch An- oder Abwesenheit des Hormons und spezifischer Co-Aktivatoren oder –Repressoren die Genexpression in Zielgeweben regulieren (Bernal 2007). Das *THRA*-Gen kodiert für drei verschiedene Isoformen des TR α (TR α 1-3), wobei nur die TR α 1-Form in der Lage ist DNA und T₃ zu binden. Die Gruppe um Skaf und Polikarpov konnte 2014 zeigen, dass an der TR α -Oberfläche eine zweite Hormon-Bindestelle für T₃ und T₄ existiert (Souza et al. 2014). Die physiologische Relevanz dieser zweiten Bindestelle muss allerdings noch untersucht werden. Das *THRB*-Gen kodiert durch alternatives Spleißen für zwei Formen (TR β 1/2), wobei beide als funktionale Schilddrüsenhormonrezeptoren identifiziert wurden. Die Expression der Isoformen TR α 1 und

TR β 1 zeigen ein entwicklungs- und gewebespezifisches Muster (Williams et al. 2011). Mit der Entdeckung des Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor als T3/T4-bindendes Membranprotein zeigt sich neben dem klassischen SDH-vermittelten Weg, dass SDH ihre biologische Aktivität auch über einen nicht-genomischen Weg ausüben (Abbildung 1). Über die Bindung an einen membranständigen Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor bzw. über die intrazelluläre Bindung an TR β wird der PI3K-Signalweg oder via der Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptorbindung der MAPK/ERK-Signalweg aktiviert und so ebenfalls die Genexpression auf nicht-klassische Weise gesteuert (Davis et al. 2005; Moeller et al. 2011a).

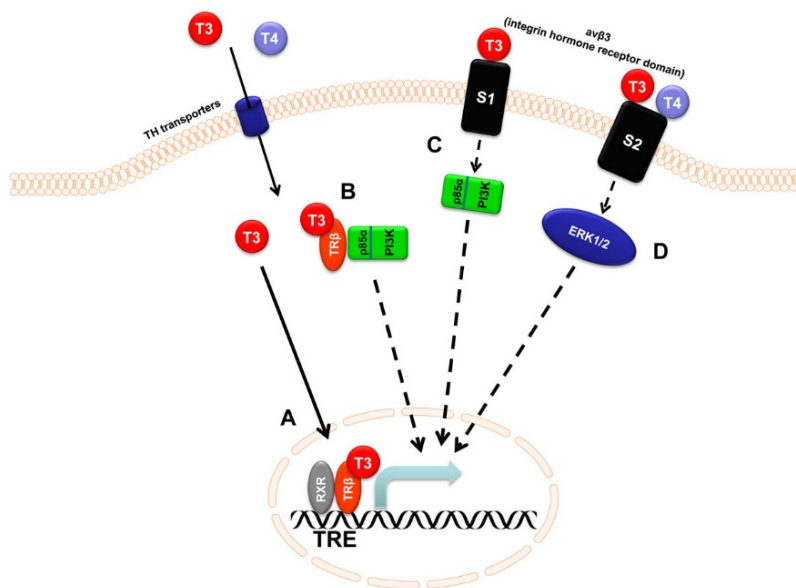


Abbildung 1: Darstellung Schilddrüsenhormon-vermittelter Transkriptionsaktivitäten. A) Klassischer Weg via TRE/TR-Bindung. B) Aktivierung PI3K-Signalweg via TR β -Bindung. C) Aktivierung PI3K-Signalweg via Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptorbindung. D) Aktivierung MAPK/ERK-Signalweg via Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptorbindung. Aus Moeller et al. (2011b).

Damit T3 aktiv die Genexpression steuern kann, kann dieses neben der Sezernierung durch die Schilddrüse (ca. 20%) in den Zielzellen lokal aus T4 konvertiert werden. Dies geschieht mit Hilfe selenhaltiger Enzyme, den Dejodasen. Bisher sind in den meisten Vertebraten die drei Formen Typ I-III Dejodase, kodiert durch die Gene Dejodase (DIO) 1, 2 und 3, bekannt. Neben einer gewebes- und entwicklungsspezifischen Expression, katalysieren diese drei Enzyme eine Dejodierung am Phenol- bzw. Tyrosylring (Köhrle 2002). Typ I-Dejodase ist stark in Leber, Niere, Hypophyse und Schilddrüse exprimiert und dejodiert sowohl am Phenolring (Bildung T3 aus T4), als auch am Tyrosylring (Bildung rT3 aus T4). Die Typ II-Dejodase ist stark in braunem Fettgewebe, im Gehirn, besonders in Gliazellen und Tanyzyten, Thymus und Plazenta exprimiert. Diese Form ist besonders für die lokale T3-Bildung aus T4 verantwortlich und sorgt so zum Beispiel im Gehirn für die Aufrechterhaltung des euthyreoten Zustands. Die Typ III-

Dejodase ist besonders stark in fetalem Gewebe, Plazenta und Gehirn exprimiert. Sie sorgt vor allem für die Inaktivierung von SDH durch Dejodierung am Tyrosylring (T3 zu 3,3'-T2; T4 zu rT3) (Köhrle 2002). Die Abbildung 2 fasst die eben beschriebenen durch Dejodase katalysierten Reaktionen anhand der Strukturformeln der einzelnen SDH zusammen.

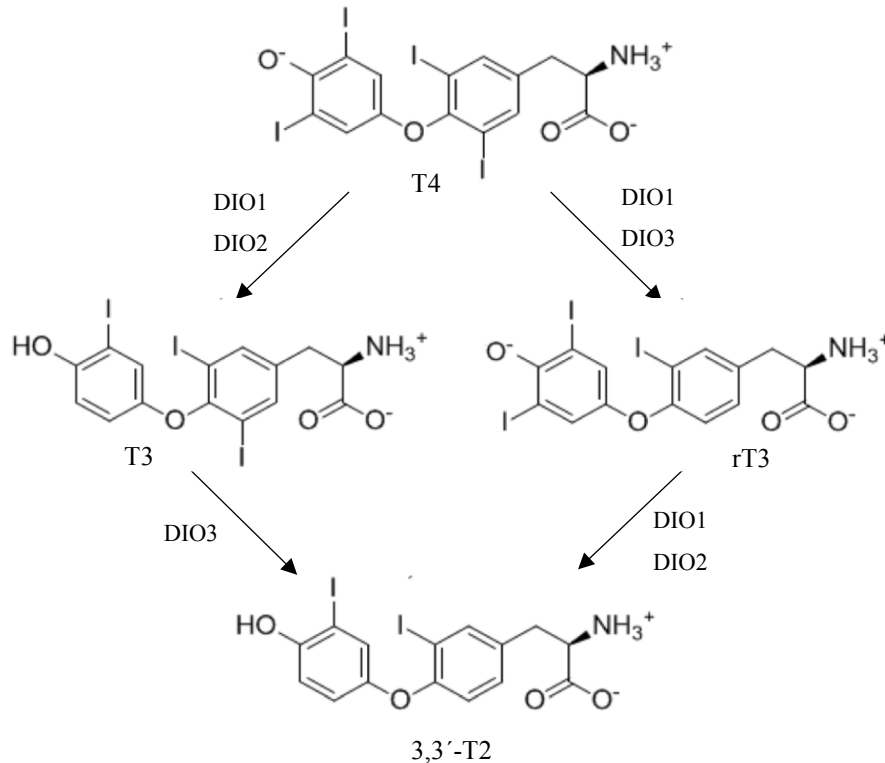


Abbildung 2: Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen mittels Dejodasen. T4 wird entweder durch Dejodierung am Phenylring zum biologisch aktiven T3 (via DIO1, DIO2) oder mittels Tyrosylring-Dejodierung zum inaktiven rT3 (via DIO1, DIO3) umgewandelt. Ein weiterer Abbau zu 3,3'-T2 erfolgt ebenfalls mittels Phenol- oder Tyrosylringdejodierung.

Durch Decarboxylierung und anschließende oxidative Desaminierung werden die klassischen Jodthyronine in weitere Metabolite, wie zum Beispiel Thyronamine (TAM) und Jodthyroessigsäuren (TAC) verstoffwechselt. Neben den bereits erwähnten Dejodasen spielen Decarboxylasen (DC) und Monoaminoxidasen (MAO) hierbei eine Rolle (Wood et al. 2009). Biologische und pharmakologische Effekte konnten für 3-Iodothyronamin (3-TIAM) und 3-Jodthyroessigsäure (TA1) nachgewiesen werden (Scanlan et al. 2004; Hoefig et al. 2015).

1.1.1 Aufbau der Schilddrüse

Anatomisch ist die Schilddrüse beidseitig der Luftröhre unterhalb des Kehlkopfes gelegen. Sie besteht aus zwei Lappen, die über eine Gewebebrücke (*Isthmus glandulae thyroideae*), welche in der Maus nicht vorhanden ist, miteinander verbunden sind. Aufgebaut ist die Schilddrüse aus Follikeln, welche aus SDH-bildenden Zellen, den Thyreozyten, bestehen und als einschichtiges

Epithel angeordnet sind. Im Inneren der Follikel befindet sich das Kolloid, dessen Hauptbestandteil das SDH-Vorläuferprotein Thyreoglobulin (Tg) ist. Die beiden Schilddrüsenlappen sind von zwei Bindegewebskapseln umgeben und ein dichtes Kapillarnetz zwischen den Follikeln sorgt für eine ausreichende Blutversorgung. Zwischen den einzelnen Follikeln findet man die C-Zellen, welche das Hormon Calcitonin produzieren, welches neben dem Parathormon der Nebenschilddrüse den Calciumhaushalt reguliert.

1.1.2 Schilddrüsenhormonbiosynthese

Schilddrüsenhormone werden in den Thyreozyten der Schilddrüse gebildet. Vorläufermolekül ist das im Follikellumen befindliche Thyreoglobulin. Jodid wird aus dem Blut aufgenommen und durch einen ATP-abhängigen Transportmechanismus (Na^+/K^+ -ATPase) entlang eines Natriumgradienten ein Jodid-Ion mit zwei Natrium-Ionen in das Lumen der Thyreozyten transportiert. Dieser Prozess wird durch den Natrium/Jodid-Symporter (NIS) gesteuert, welcher basolateral an der Membran lokalisiert ist (Dohan et al. 2003). Über den apikal lokalisierten Ionenkanal Pendrin wird das aufgenommene Jodid in das Follikellumen abgegeben (Royaux et al. 2000). Durch apikal membranassoziierte Thyreoxidasen (DUOX1/2) wird H_2O_2 gebildet, welches das membranständige Enzym Thyreoperoxidase (TPO) zur Oxidation des Jodid nutzt (De Deken et al. 2000). Anschließend erfolgt die Jodierung der Tyrosylreste im Thyreoglobulin und die Kopplung der entstandenen Mono- und Dijodtyrosine (MIT und DIT) zu T_4 (DIT + DIT) und zu geringem Anteil T_3 (MIT + DIT), katalysiert durch die H_2O_2 -abhängige TPO (Taurog et al. 1996). Die Freisetzung der SDH erfolgt, je nach Bedarf, über Endozytose in den Thyreozyten und einem Kathepsin-abhängigen lysosomalem Abbau (Friedrichs et al. 2003). Über spezifische SDH-Transporter werden T_4 und T_3 in das Blut abgegeben. Abgebaut und ausgeschieden werden SDH in der Leber über die Galle durch Glukuronidierung und Sulfatierung sowie Dejodierung. Nicht benötigte MIT und DIT werden im Thyreozyten durch sog. Dehalogenasen (Dehal1) dehalogeniert und so das Jodid für eine erneute SDH-Biosynthese rückgewonnen (Gnidehou et al. 2004). Anhand dieses komplexen Weges wird bereits ersichtlich, dass Fehlregulationen zu erheblichen Einschränkungen oder Krankheiten in betroffenen Personen führen können. Eine adäquate Jodzufuhr spielt dabei eine essentielle Rolle, denn ein Mangel durch jodarme Ernährung kann zu Hypothyreose führen. Zudem können Mutationen im *NIS*- oder *Pendrin*-Gen zu einer verringerten Jodtransportaktivität und somit zu Hypothyreose führen (Spitzweg et al. 2010; Dossena et al. 2011).

1.2 Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse (HPT-Achse)

Die SDH-Freisetzung in die Blutbahn unterliegt einem streng kontrollierten thyreotropen Regelkreislauf, der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse (siehe Abbildung 3). Zu diesem Kreislauf zählen drei Komponenten, wobei das Gehirn die oberste Instanz darstellt: Nervenzellen des Hypothalamus produzieren das Peptidhormon *Thyrotropin-Releasing hormone* (TRH), welches den TRH-Rezeptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor) in thyreotropen Zellen der Hypophyse stimuliert und die Produktion und Freisetzung des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH) aktiviert. Dieses bindet an den basolateral membranständigen TSH-Rezeptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor) der Thyreozyten, wodurch die Jodaufnahme, die TPO-Aktivität und die Freisetzung von T4 und T3 in die Blutbahn stimuliert werden. Damit es nicht zum Überschuss an SDH im Körper kommt, unterliegt die Bildung und Freisetzung einer negativen Rückkopplung. SDH gelangen über die Blutbahn in den Hypothalamus und die Hypophyse, wo sie die TRH- und TSH-Synthese unterdrücken und folglich die SDH-Produktion. Sinkt die T4-/T3-Konzentration im Blut, wird die HPT-Achse wieder stärker aktiviert und es werden vermehrt SDH produziert und ausgeschüttet. Fehlregulationen in diesem thyreotropen Kreislauf führen zu einer Schilddrüsenunterfunktion, d.h. SDH-Mangel (Hypothyreose) oder einer Schilddrüsenüberfunktion, d.h. SDH-Überschuss (Hyperthyreose).

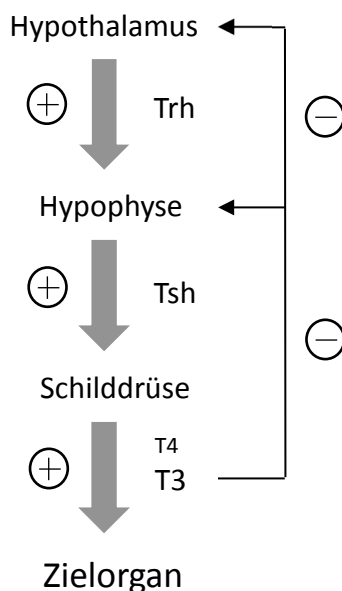


Abbildung 3: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse. Das hypothalamisch produzierte TRH stimuliert die Produktion und Sezernierung des hypophysären TSH, welches in der Schilddrüse die Produktion von T4 und T3 anregt. Über die Blutbahn werden T4 und T3 zu ihren Zielorganen transportiert, um dort spezifisch ihre Aktivität ausüben zu können. Kommt es zu einem Überschuss an T3 und T4 unterdrückt ein negativer Rückkopplungsmechanismus die Neubildung von TRH und TSH und somit auch die Schilddrüsenhormonbiosynthese.

1.3 Schilddrüsenhormontransporter

Bereits in den 1950er Jahren wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen Versuche mit radioaktiv-markierten SDH und deren Aufnahme in Gewebeschnitten von Herz, Leber und Niere durchgeführt. Alle kamen zu dem Ergebnis, dass es sich um eine Aufteilung der Metabolite durch passive Diffusion zwischen den einzelnen Kompartimenten handelt, abhängig von der Kapazität und Konzentration des TBG als Bindeprotein und dem freien Hormon (Freinkel et al. 1957; Beraud et al. 1958). Die bis dato erworbenen Erkenntnisse wurden in der „Freien Hormon-Hypothese“ von Robbins und Rall zusammengefasst: Die freie oder diffundierbare SDH-Konzentration im Blut und extrazellulären Gewebe bestimmt die Flussrate, bei welcher SDH zu ihrem Aktionsort gelangen bzw. abgebaut werden (Robbins et al. 1960). Erst in den 1970er Jahren zeigten die Arbeitsgruppen um Hennemann und Rao anhand von Versuchen mit isolierten Rattenleberzellen, dass es sich beim T3-Transport um einen aktiven, Energie-abhängigen Transport handeln muss (Krenning et al. 1978; Eckel et al. 1979). Es folgten weitere SDH-Transportstudien in verschiedensten humanen, murinen und Rattenzellen (zusammengefasst in Hennemann et al. (2001)). Zahlreiche Transporter wurden seither kloniert und als SDH-Transporter funktional charakterisiert. Darunter wurde der Monocarboxylattransporter 8 (MCT8), als spezifischer SDH-Transporter identifiziert (siehe 1.3.1). Aufgrund ihrer teilweise überlappenden Substratspezifität werden sie verschiedenen Familien zugeordnet: *Monocarboxylate Transporter* (MCT), *L-Type Amino Acid Transporter* (LAT), *Organic Anion Transporter Polypeptides* (OATP) und *Sodium/Taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP/SLC10A1). Neben einem spezifischen Substratspektrum und Substrat-Kinetiken zeigen die Transporter auch unterschiedliche entwicklungs- und organspezifische Expressionsmuster, wodurch sie klare Rollen in der SDH-Verfügbarkeit in den Organen einnehmen. Die Tabelle 1 fasst die wichtigsten SDH-Transporter und deren Expressionsmuster im Gehirn zusammen.

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten humanen und murinen Schilddrüsenhormontransporter und deren Expressionsmuster im Gehirn. Sofern nicht anders gekennzeichnet, handelt es sich um die Proteinexpression in den jeweiligen Gehirnarealen. (T) = Nachweis mittels Transkriptexpression.

SDH-Transporter	Expression im Gehirn	Referenz
hMCT8/SLC16A2	Cortex, Hippocampus, Hypothalamus, Tanyzyten, Plexus Choroideus	(Chan et al. 2011; Friesema et al. 2012; Kallo et al. 2012) (Roberts et al. 2008; Wirth et al. 2009; Braun et al. 2011a)

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten humanen und murinen Schilddrüsenhormontransporter und deren Expressionsmuster im Gehirn. Sofern nicht anders gekennzeichnet, handelt es sich um die Proteinexpression in den jeweiligen Gehirnarealen. (T) = Nachweis mittels Transkriptexpression.

SDH-Transporter	Expression im Gehirn	Referenz
mMCT8/SLC16A2	Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Tanyzyten, Hypothalamus	(Roberts et al. 2008; Wirth et al. 2009; Braun et al. 2011a)
hMCT10/SLC16A10	Cortex, Plexus choroideus, Hypothalamus	(Wirth et al. 2009; Alkemade et al. 2011)
mMCT10/SLC16A10	Cortex (T), Hippocampus (T), Plexus choroideus (T)	(Wirth et al. 2009; Braun et al. 2011a)
hLAT1/SLC7A5	Cortex (T)	(Wirth et al. 2009; Chan et al. 2011)
mLAT1/SLC7A5	Cortex, Cerebellum	(Wirth et al. 2009; Braun et al. 2011a)
hLAT2/SLC7A8	Cortex, Hippocampus, Plexus choroideus, Mikroglia (fetal)	(Wirth et al. 2009; Chan et al. 2011)
mLAT2/SLC5A8	Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Plexus choroideus	(Wirth et al. 2009; Braun et al. 2011a)
hOATP14/SLCO1C1	Hypothalamus, Plexus choroideus	(Roberts et al. 2008; Wirth et al. 2009; Alkemade et al. 2011)
mOATP14/SLCO1C1	Plexus choroideus, Tanyzyten, Gefäße	(Roberts et al. 2008; Wirth et al. 2009; Braun et al. 2011a)

Aufgrund von identifizierten humanen pathogenen Mutationen und SDH-Transporter-defizienten Tiermodellen konnte besonders den Transportern MCT8, MCT10 und OATP14 eine funktionale Rolle im SDH-Metabolismus nachgewiesen werden (siehe 1.3.3).

1.3.1 Der Monocarboxylattransporter 8 (MCT8)

Der Monocarboxylattransporter 8 (MCT8) wurde bereits 1994 von Lafreniere *et al.* als Gen identifiziert und erhielt den Namen XPCT (*X-linked PEST-containing transporter*). Seine Rolle im SDH-Transport blieb bis dahin noch unerkannt (Lafreniere et al. 1994). MCT8 (offizieller Genname: *SLC16A2*) ist ein Transmembranprotein mit 12 Domänen, wobei N- und C-Terminus intrazellulär vorliegen, und zählt zur Familie der *Major Facilitator Superfamily* (MFS). Das humane *MCT8*-Gen besteht aus sechs Exons mit zwei alternativen Startcodons. Somit kodiert

es für zwei alternative Proteine mit 613 bzw. 539 Aminosäuren (AS) (Schwartz et al. 2007). Bisher ist noch unklar, ob die verlängerte N-terminale Variante eine spezifische Rolle spielt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass wenn das erste Methionin-Startcodon vorhanden ist, diese längere Variante bevorzugt exprimiert wird (Kinne et al. 2009). In vielen anderen Spezies, wie Maus und Ratte, fehlt das erste Startcodon, wodurch nur die kürzere Variante mit 539 AS exprimiert wird. MCT8 ist auf dem humanen Chromosom Xq13 lokalisiert und Mutationen im *MCT8*-Gen führen zu einer schweren Form psychomotorischer Retardierung, dem Allan-Herndon-Dudley Syndrom (siehe 1.3.2). Friesema *et al.* identifizierten 2003 Mct8 aus der Ratte als spezifischen Schilddrüsenhormontransporter für T4, T3, rT3 und 3,3'-T2 (Friesema et al. 2003). Im Gegensatz zu anderen Membrantransportern der Monocarboxylattransporter-Familie, wie zum Beispiel MCT1-4 und MCT10, ist MCT8 nicht in der Lage, aromatische AS wie Tyrosin, Phenylalanin oder Tryptophan (Friesema et al. 2003; Braun et al. 2013) und Monocarboxylate, wie Laktat (van der Deure et al. 2009) zu transportieren. Zudem benötigt es kein assoziiertes Protein, wie zum Beispiel Basigin/CD147 oder Embigin/GP70, um funktional an der Plasmamembran exprimiert zu werden. MCT8 hat keine Phosphorylierungs- und Glykosylierungsstellen, ist aber in der Lage Dimere und höhere Oligomere einzugehen (Biebermann et al. 2005; Visser et al. 2009b). Der MCT8-vermittelte SDH-Transport läuft Energie-unabhängig ab und ist sowohl an der Aufnahme, als auch der Abgabe von SDH in und aus Zellen beteiligt (Visser et al. 2009a; Kinne et al. 2010). Bisher ist die Struktur des MCT8 noch nicht aufgeklärt. Basierend auf der Kristallstruktur des bakteriellen Glycerol-3-Phosphattransporter (GlpT) wurde ein MCT8 Homologiemodell entwickelt. Struktur-Funktionsanalysen identifizierten zwei Aminosäuren im Transportkanal, die an der Substraterkennung beteiligt sind: Arginin 345 (Arg345) in der Transmembranhelix 8 und Aspartat 498 (Asp498) in der Transmembranhelix 10. Durch Mutationen des Arg345 und Asp498 zu Alanin und funktionalen radioaktiven Transportstudien mit diesen MCT8 Mutanten zeigte sich, dass diese beiden AS essentiell für den MCT8-vermittelten T3 Transport sind (Kinne et al. 2010; Groeneweg et al. 2014). Des Weiteren wurde Histidin an Stelle 192 als wichtige AS im MCT8-vermittelten SDH-Transport identifiziert (Braun et al. 2013; Groeneweg et al. 2013).

1.3.2 Das Allan-Herndon-Dudley Syndrom

Das Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung, charakterisiert durch schwere psychomotorische Retardierung (Allan et al. 1944). Betroffene Personen leiden bereits in der frühen Kindheit unter Muskelhypotonie und einem

schwerwiegenden intellektuellen Defizit. Kurz nach der Identifizierung des MCT8 als spezifischen SDH-Transporter wurden Mutationen im *MCT8*-Gen in Verbindung mit mentaler X-gekoppelter psychomotorischer Retardierung gebracht (Dumitrescu et al. 2004; Friesema et al. 2004). Bereits ein Jahr später wurde durch Schwartz *et al.* eine Verbindung zu dem bereits 1944 beschriebenen Allan-Herndon-Dudley Syndrom hergestellt (Schwartz et al. 2005). Sie identifizierten in sechs Familien Mutationen im *MCT8*-Gen. Zudem zeigten die Patienten schwerwiegende neurologische und motorische Einschränkungen sowie abnormale SDH-Konzentrationen, die typisch für diese Erkrankung sind: stark erhöhte T3- und verminderte T4-Serumkonzentrationen, sowie normale bis leicht erhöhte TSH-Werte. Bis heute wurden in mehr als 45 Familien mit 125 betroffenen Patienten AHDS-Symptome in Verbindung mit abnormalen SDH-Konzentrationen und Mutationen im *MCT8*-Gen (> 75 identifizierte Deletionen, Insertionen, Punktmutationen) gebracht. Als Ursache für die neurologischen Defekte in AHDS-Patienten wird ein verminderter T3-Transport in das Gehirn, speziell in Neurone, während der fetalen Entwicklung vermutet (Friesema et al. 2006). Dennoch ist der AHDS-Phänotyp der Patienten nicht mit klassischen Anzeichen einer unbehandelten angeborenen Hypothyreose oder Hypothyreose-induzierten Mausmodellen zu vergleichen. Bisher gibt es keine verlässlichen Behandlungsmöglichkeiten. Die Einnahme von variierenden SDH-Kombinationen mit und ohne Blockierung der peripheren T3-Konzentration führte zwar teilweise, bei hohen Konzentrationen, zur Normalisierung der SDH-Konzentrationen, jedoch hatte dies keine positiven Auswirkungen auf die kognitiven Funktionen (Wemeau et al. 2008; Visser et al. 2013). Vielversprechend scheint der Einsatz von SDH-Analoga, namens DITPA, Triac und Tetrac, welche unabhängig von MCT8 in Zellen transportiert werden und die SDH-abhängige Genexpression steuern (Verge et al. 2012; Horn et al. 2013). Jedoch ist hier noch eine Menge an Forschungsarbeit und klinischen Studien nötig. In den Niederlanden befindet sich die Anwendung von Triac, als T3 Analogon, bereits in der klinischen Phase II (NCT02060474).

1.3.3 *Mct8*-defiziente Mausmodelle mit Fokus auf den Gehirn-Phänotyp

Kurz nach der Identifikation von MCT8 als spezifischen T3-/T4-Transporter generierten und charakterisierten verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander *Mct8*-defiziente Mausmodelle, um den pathophysiologischen Effekt des *Mct8*-Verlustes genauer zu analysieren. Alle zeigten, dass diese Mäuse den endokrinologischen Phänotyp (erhöhtes T3, erniedrigtes T4 und normales bis leicht erhöhtes TSH) replizieren, jedoch nicht den neurologischen, wie er in männlichen AHDS-Patienten beobachtet wird (Dumitrescu et al. 2006; Trajkovic et al. 2007;

Wirth et al. 2011). Messungen der Dejodase-Aktivität in verschiedenen Organen zeigte, dass Leber (Dumitrescu et al. 2006; Trajkovic et al. 2007) und Niere (Trajkovic-Arsic et al. 2010) in einem hyperthyreoten (erhöhte Dio1-Aktivität) Zustand sind. Das Gehirn im Gegensatz dazu aufgrund einer erhöhten Dio2- und reduzierten Dio3-Aktivität eher in einem hypothyreoten Zustand ist (Dumitrescu et al. 2006; Trajkovic et al. 2007). Zudem konnten Trajkovic *et al.* zeigen, dass die Aufnahme von T3 in das Gehirn *Mct8*-defizienter Mäuse stark vermindert ist, die T4-Aufnahme bleibt jedoch unbeeinträchtigt (Trajkovic et al. 2007). Wirth *et al.* konnten nachweisen, dass das Gehirn *Mct8*-defizienter Mäuse nicht generell in einem hypothyreoten Zustand ist. Anhand von Verhaltenstest (allgemeines Bewegungs-, Angst- und Putzverhalten) zeigten sich Änderungen, die einerseits für eine vorliegende Hyperthyreose und andererseits für eine Hypothyreose des Gehirns sprechen (Wirth et al. 2009).

Der Monocarboxylattransporter 10 (MCT10) wurde als *T-Type Amino Acid Transporter* (TAT1) identifiziert, welcher aromatische Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin) transportiert (Kim et al. 2002). Dieser Transporter weist eine Aminosäuren-Homologie zu MCT8 von 80% in den Transmembrandomänen auf (van der Deure et al. 2010). Sechs Jahre später zeigten Friesema *et al.*, dass MCT10 in der Lage ist SDH zu transportieren (Friesema et al. 2008). Basierend auf diesen Daten analysierte die Gruppe um Prof. Heike Heuer das Doppel-knockout (DKO) Mausmodell *Mct8/Mct10*, um die spezifische Rolle des *Mct10* im SDH-Transport und Metabolismus genauer zu untersuchen. T3- und T4-Serumkonzentrationen wurden in *Mct10* KO, *Mct8* KO, *Mct8/Mct10* DKO und Wildtypgeschwistern als Kontrollen gemessen. *Mct10* KO-Mäuse zeigen normale SDH-Konzentrationen, DKO-Tiere zeigen in beiden untersuchten Altersgruppen stark erhöhte T3-Konzentrationen, wie im globalen *Mct8* KO beobachtet. Die Analyse des SDH-Großhirngehaltes in adulten DKO-Tieren ist leicht vermindert, aber nicht so stark wie im *Mct8* KO-Modell, was für eine teilweise Rettung des endokrinen *Mct8*-defizienten Gehirnpheänotyps durch *Mct10* spricht. Insgesamt hat der Verlust von *Mct8* und *Mct10* keinen starken Effekt auf den Gehirnpheänotyp, dafür einen umso größeren auf Leber, Niere und Schilddrüse (Müller et al. 2014).

2014 generierte erneut die Gruppe um Prof. Heike Heuer ein weiteres SDH-Transporter Doppel-knockout Modell: *Mct8/Oatp14*. *Oatp14* wird stark in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke in Mäusen exprimiert. Im menschlichen Gehirn lässt sich dagegen nur eine sehr schwache Expression nachweisen. Dies ließ die Gruppe vermuten, dass *Oatp14* den Verlust von *Mct8* in der Maus kompensiert und so der beobachtete neurologische Phänotyp in AHDS-Patienten im globalen *Mct8*-defizienten Mausmodell nicht ausgeprägt ist. T3-, T4- und TSH-Serumkonzentrationen der DKO-Maus zeigen das gleiche Muster, wie *Mct8*-defiziente Mäuse.

In diesem Modell wurde komplett die Aufnahme von T4 und T3 in das Gehirn blockiert, was sich in einem stark reduzierten Gehalt im Groß- und Kleinhirn in 21 Tage alten DKO-Mäusen widerspiegelt. Um adäquate SDH-Konzentrationen im Gehirn aufrecht zu erhalten, ist die Dio2-Aktivität stark erhöht, die Dio3-Aktivität stark vermindert. Die *Trh*-Transkriptexpression ist dementsprechend im Hypothalamus ebenfalls stark erhöht. Mit diesem DKO-Mausmodell hat die Arbeitsgruppe ein AHDS-Modell generiert an dem pathogene SDH-Mechanismen studiert werden können (Mayerl et al. 2014).

Als weiterer SDH-Transporter ist *Lat2* ein interessanter Kandidat. Die Gruppe um Prof. Ulrich Schweizer zeigte, dass dieser Transporter potentiell den Verlust von *Mct8* in der Maus kompensieren könnte. Sie zeigten, dass *Lat2* während der Entwicklung im Neuron der Maus stark exprimiert wird, im Menschen ist dieser dagegen in frühen Entwicklungsstadien nicht nachzuweisen (Braun et al. 2011b). Die Gruppe um Juan Bernal generierte folgend ein weiteres DKO-Mausmodell: *Mct8/Lat2* an dem sie den Einfluss von *Lat2* während der frühen postnatalen Gehirnentwicklung analysierten. Sie zeigten, dass *Lat2* eine wichtige Rolle in einem sehr kurzen Zeitfenster vom postnatalen Tag 0 bis Tag 5 (P0-P5) spielt. Hier zeigte sich, dass die Abwesenheit von *Lat2* den Effekt von *Mct8*-Defizienz unterdrückt, was sich in einem transienten Anstieg der T3-Konzentration und wichtiger SDH-regulierter Gene im zerebralen Cortex äußerte. Nach P5 konnte der *Lat2*-vermittelte Effekt nicht mehr beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Lat2* als SDH-Transporter eine wichtige Rolle im frühen postnatalen Entwicklungsprozess des Gehirns einnimmt (Nunez et al. 2014).

1.4 Schilddrüsenhormone während der Entwicklung

Schilddrüsenhormone haben einen enormen und vielseitigen Einfluss bereits ab der Schwangerschaft bis ins Erwachsenenalter auf die Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems. Deutlich wird der entwicklungsabhängige Einfluss von SDH auf die Metamorphose von Amphibien: Zu Beginn der Metamorphose ist ein starker Anstieg von SDH zu verzeichnen, zu dem Zeitpunkt, wenn neue Körperteile (Gliedermaßen) ausgebildet werden, die Resorption des Schwanzes und die Umwandlung der Organe (Haut, Gastrointestinaltrakt, Nervensystem) ablaufen (Laudet 2011). Die Haltung der Larven in einem jodarmen Wasser stoppt die Metamorphose und es kommt lediglich zum Größenwachstum der Kaulquappen. Anhand dieses Modells wird deutlich, wie wichtig die zeitliche und lokale Verfügbarkeit von SDH im Entwicklungsprozess ist. Im Menschen zeigt sich ebenfalls solch eine zeitliche SDH-abhängige Entwicklung von Organen. Vor allem das fetale Gehirn ist zu Beginn der

Schwangerschaft, wenn der Fetus selbst noch keine funktionale Schilddrüse entwickelt hat, auf die adäquate Versorgung durch die Mutter angewiesen. Kommt es zu einer maternalen Hypothyreose während der Schwangerschaft kann dies zu Hörschäden-, Lern- und Feinmotorik-Beeinträchtigungen des Kindes kommen, wenn diese unerkannt bleibt (Bernal 2000; Zoeller et al. 2004). Wird eine angeborene Hypothyreose nicht rechtzeitig erkannt und behandelt, entwickelt sie sich zum Kretinismus, ein Krankheitsbild charakterisiert durch Fehlbildungen des Skelettes, mentaler Retardierung und Sprachstörungen. Der aktive Metabolit T3 beeinflusst zudem zahlreiche anabole und katabole biochemische Prozesse: Gluconeogenese und Glycolyse, Liponeogenese und Lipolyse sowie den Protein- und Energiestoffwechsel. Ein Einfluss von T3 konnte auch auf Haarzellen der Cochlea (Forrest et al. 1996) sowie auf Photorezeptoren der Retina (Bort et al. 2002) gezeigt werden.

1.4.1 Schilddrüsenhormone während der Gehirnentwicklung

Wie bereits erwähnt, sind SDH in der korrekten Entwicklung des zentralen Nervensystems unabdingbar. Sie sind unter anderem verantwortlich für die neuronale Migration in Cerebellum und Neocortex (Auso et al. 2004), die Verzweigung von Dendritenbäumen der Purkinje-Zellen im Kleinhirn (Heuer et al. 2003), die Reifung von inhibitorischen Interneuronen (Gilbert et al. 2007) und die Reifung und Differenzierung von Oligodendrozyten (Barres et al. 1994; Harsan et al. 2008). Demzufolge stellten sich Forschergruppen bereits in den 1970er Jahren die Frage, wie gelangen SDH in das Gehirn und welchen Anteil trägt dabei die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und welchen Anteil die Blut-Liquor-Schranke (BLS)? Lange bevor SDH-Transporter identifiziert und charakterisiert wurden, glaubte man, dass das SDH-Bindeprotein Transthyretin (TTR) an der T4-Aufnahme in das Gehirn über die BHS und BLS beteiligt ist. Anhand von radioaktiv-markierten T4-Injektionsexperimenten in Ratte und Schaf zeigte sich eine Akkumulation der SDH im Plexus Choroideus, was zu der Hypothese führte, dass T4 über diesen aufgenommen wird, wo es an das neu-synthetisierte TTR bindet und so seine Verteilung im CSF stattfindet (Dickson et al. 1987; Schreiber et al. 1990). Untersuchungen der *TTR*-knockout Maus widerlegten diese Hypothese, da diese Mäuse keine phänotypischen Veränderungen im Gehirn zeigten und auch T4-, T3- und TSH-Serumkonzentrationen unverändert waren (Palha et al. 1994; Palha et al. 1997). Trotzdem stellt TTR ein wichtiges SDH-Bindeprotein im Plexus Choroideus dar (Palha et al. 2000). Erst mit der Identifikation von SDH-Transportern wurde Licht ins Dunkel gebracht. Die heutige Hypothese zur SDH-Verfügbarkeit im Gehirn sieht folgendermaßen aus: SDH werden an der luminalen Seite der BHS über in der Endothelzellmembran lokalisierte Transporter (Lat1/2, Oatp14, Mct8)

aufgenommen. T₄ gelangt wiederum via Mct8 und/oder Oatp14 in den Liquor, wo TTR das einzige SDH-Bindeprotein ist, und dann zum Astrozyten (Lat1/2, Mct8), wo es durch die Typ II-Dejodase lokal in den aktiven Metaboliten T₃ dejodiert wird. Schließlich gelangt T₃ in den Neuron via Lat1/2 und/oder Mct8, um diesen damit zu versorgen und seine Aktivität am nukleären SDH-Rezeptor ausüben zu können und via Dio3 in die inaktive Form überführt zu werden (Abbildung 4).

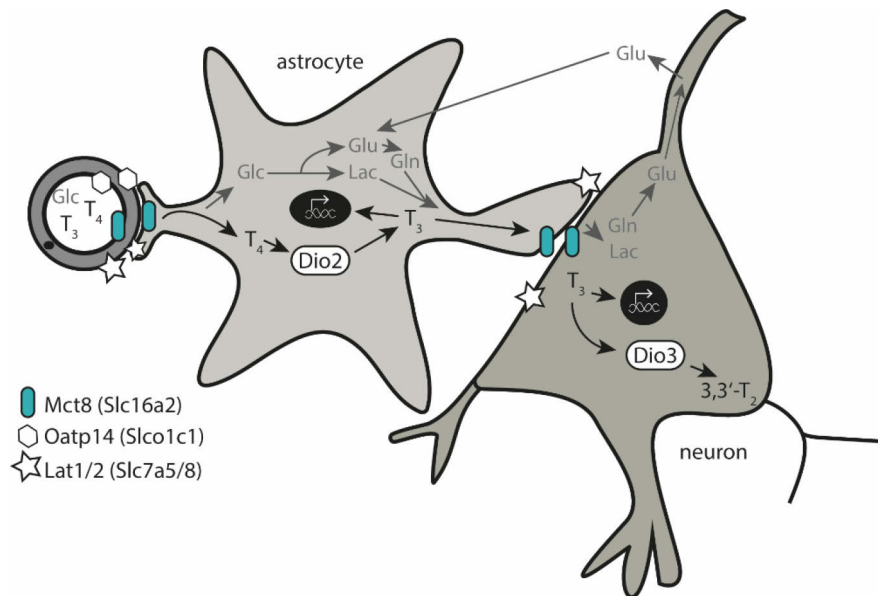


Abbildung 4: Schilddrüsenhormontransport im murinen Gehirn via spezifischer Schilddrüsenhormon-Transporter. Schilddrüsenhormone werden über Membran-assoziierte Transporter (Mct8, Oatp14) in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke aufgenommen. T₄ gelangt mittels Lat1/2 und/oder Mct8 in den Astrozyten, wo es lokal via Dio2 in den aktiven Metaboliten T₃ umgewandelt wird, um schließlich den Neuron damit zu versorgen und seine Aktivität am nukleären SDH-Rezeptor ausüben zu können.

1.4.2 Schilddrüsenhormoneinfluss auf Thermogenese und Energiestoffwechsel

Bereits 1895 zeigte Magnus-Levy, dass eine exogene Thyroxin-Gabe zu einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs, des Grundumsatzes und der CO₂-Produktion in hypo- und euthyreoten Individuen führt (Magnus-Levy 1895). Mit der Entdeckung durch Otto Warburg, dass Mitochondrien die Zellkompartimente sind in denen sich die Zellatmung abspielt, begann die Analyse der Wirkung von SDH auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel. Die Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen führten dabei eher zu kontroversen Ergebnissen: einerseits konnte eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs in isolierten Mitochondrien nach vorheriger Injektion von T₃ nachgewiesen werden, andererseits zeigten isolierte Mitochondrien nach *in vitro* Stimulation mit SDH keinen Anstieg (Horst et al. 1989; O'Reilly et al. 1992). Zudem wurden in vielen Experimenten zu hohe Dosen (10⁻⁶ bis 10⁻⁵ Molar) der SDH eingesetzt, wenn man bedenkt, dass die freie SDH-Konzentration im pM-Bereich liegt. Dies führte wiederum zu Artefakten in der Messung, da zum Beispiel die

Atmungskette komplett entkoppelt wurde. Die Entdeckung, dass 3,5-T2 als SDH-Metabolit die Aktivität der Cytochrom C Oxidase reguliert (Lanni et al. 1994), führte zu der Schlussfolgerung, dass nicht T4 und T3, sondern ihre Metabolite die Funktion der oxidativen Phosphorylierung beeinflussen. Erst mit dem Nachweis der Expression des SDH-Rezeptors p43, eine trunktierte Form des TR α 1, in Mitochondrien der Leberzellen aus Ratten (Wrutniak et al. 1995) wurde angenommen, dass SDH ihre Aktivität durch genomische Effekte vermitteln, indem sie die Expression OXPHOS-relevanter Gene beeinflussen (Li et al. 1997). Eine weitere Komponente der Thermogenese wird durch SDH beeinflusst, die Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität. In hyperthyreoten Individuen geht der erhöhte ATP Umsatz und der damit verbundene erhöhte Sauerstoffverbrauch mit einer erhöhten Expression und Aktivität dieses Enzyms einher (Somjen et al. 1981). Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren und Entkoppler der OXPHOS kann diese analysiert und reguliert werden. Dabei beeinflussen Inhibitoren die Substratoxidation, da sie spezifisch an die einzelnen Komplexe der Atmungskette binden. Entkoppler dagegen bewirken eine Trennung von Oxidation und Phosphorylierungsvorgängen, was zu einer unkontrollierten Atmung führt, gekennzeichnet durch einen Zusammenbruch des elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran und dem Stopp der ATP-Produktion, trotz funktionierendem Elektronentransport über die Komplexe I bis IV. Ein wirksamer Inhibitor der ATP Synthase ist das Antibiotikum Oligomycin. Als effektiver Entkoppler wird oft FCCP (Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon) oder DNP (2,4-Dinitrophenol) eingesetzt. Der Begriff Thermogenese beschreibt zudem, dass Wärme aufgrund von Stoffwechselaktivitäten in Zellen freigesetzt wird. SDH haben ebenfalls einen Einfluss auf diesen Prozess, der durch Entkoppler-Proteine (engl. *uncoupling proteins*, UCPs) katalysiert wird. Diese sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und konnten als T3-regulierte Gene identifiziert werden (Lanni et al. 2003). Eine starke Expression des UCP2-Gens konnte im *Nucleus arcuatus* im Hypothalamus nachgewiesen werden (Horvath et al. 1999).

1.5 Energiestoffwechsel im Gehirn

Das menschliche Gehirn benötigt, trotz seines geringen Masseanteils von gerade mal 2% der Gesamtkörpermasse, 20% des aufgenommenen Sauerstoffs und 40% der aufgenommenen Kohlenhydrate in Form von Glukose als Energielieferanten. Dieser enorme Verbrauch ist dem Aufrechterhalten von Ionen-Gradienten während zerebraler Aktivität in Form von Aktionspotentialen und Neurotransmission geschuldet. Die Interaktion zwischen Astrozyten

und Neuronen und ihre Organisation als „dreigeteilte Synapse“ (engl. *tripartite synapse*) spielt dabei eine wichtige Rolle. Ein Astrozyt steht in Kontakt mit bis zu 600 neuronalen Dendriten (Halassa et al. 2007) und mehr als 100.000 Synapsen und Blutgefäßen (Bushong et al. 2002; McCaslin et al. 2011). Durch die astrozytäre Expression von Glukose-Transportern (GLUT1) stellen sie somit die Energiesubstratversorgung und den -austausch zwischen Blutkapillaren und Neuronen her. Astrozyten sind neben Stütz- und Versorgungszellen für Neurone vor allem multifunktionale Regulatoren. Sie sind beteiligt am Auf- und Abbau überschüssiger Neurotransmitter, wie Glutamat (Glu) und γ -Aminobuttersäure (GABA), aus dem synaptischen Spalt nach Beendigung einer neuronalen Erregung/Hemmung (Anderson et al. 2000), kontrollieren die lokale Blutversorgung (Zonta et al. 2003) und versorgen Neurone mit Substraten für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) (Pellerin et al. 1998). Neben Glukosetransportern exprimieren Astrozyten zahlreiche Neurotransmitter-Rezeptoren (Glutamat-, GABA-, Acetylcholin-Rezeptor) und Transporter (MCT1 für Laktat, Slc1a2 für Glutamat). Wie bereits erwähnt schützen Astrozyten Neurone vor Glutamatoxizität indem sie dieses durch Na^+ -abhängige exzitatorische Aminosäure-Transporter (EAATs) aus dem synaptischen Spalt aufnehmen und in das von Neuronen verwertbare Glutamin (Gln) in einer ATP-abhängigen Reaktion via dem Astrozyten-spezifischen Enzym Glutaminsynthetase (GS) umwandeln. Glutamin wird in die Neurone zurück transportiert, wo es erneut in Glutamat via Phosphat-aktivierter Glutaminase (PAG) verstoffwechselt wird und dem Neuron als Neurotransmitter wieder zur Verfügung steht. Dieser Prozess wird als Glutamat-Glutamin-Shuttle bezeichnet (Barres 1991). Das aufgenommene Glutamat kann aber auch in Metabolite (α -Ketoglutarat) des Citratzyklus (TCA) verstoffwechselt werden (Abbildung 5). Neben Glutamat als anregenden Neurotransmitter gibt es GABA, als inhibitorischen Neurotransmitter. Nach Ausschüttung in den präsynaptischen Spalt und Bindung an den GABA-Rezeptor des postsynaptischen Neurons kommt es zur Stabilisierung des Ruhepotentials und die Nervenzelle ist weniger erregbar. GABA wird ebenfalls effektiv aus dem präsynaptischen Spalt entsorgt. Der größte Teil wird selbst vom Neuron wieder aufgenommen. Ein geringer Anteil wird im Astrozyten über Succinat und α -KG zu Glutamat recycelt (GABA Shunt) (Rodrigues et al. 2013b).

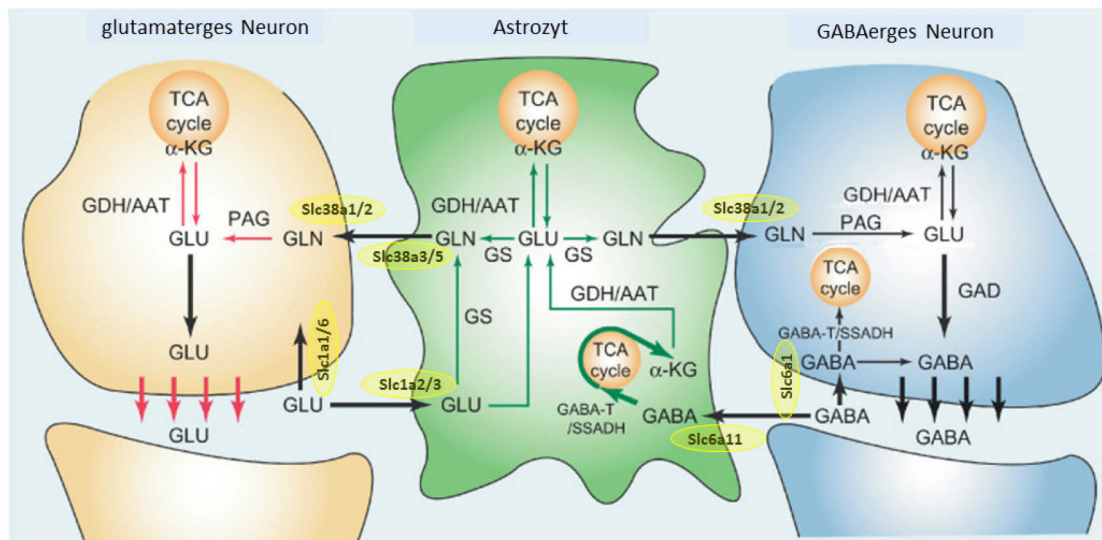
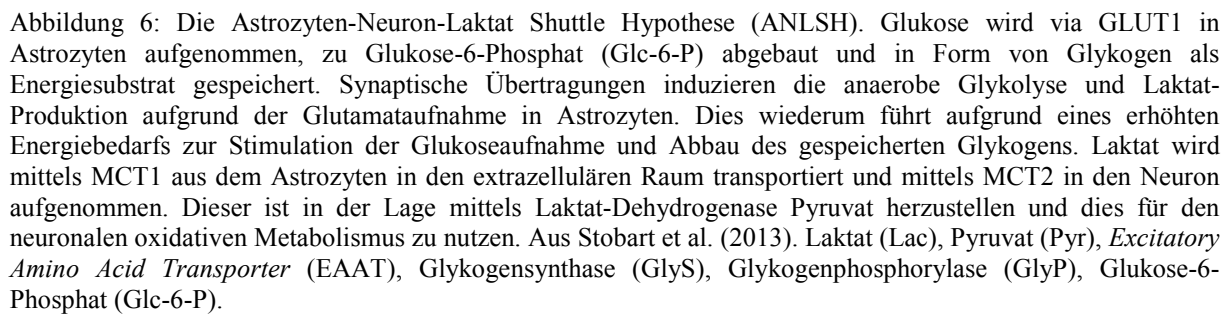


Abbildung 5: Der Glutamin-Glutamat-GABA Zyklus zwischen Astrozyten und Neuronen. Der anregende Neurotransmitter Glutamat (Glu) stimuliert post-synaptische Neuronen. Das Signal wird gestoppt durch die Transporter-vermittelte Aufnahme in einem Na^+ /Glutamat Co-Transport in den Astrozyten. Im Astrozyten wird Glutamat via Glutaminsynthetase (GS) zu Glutamin (Gln) verstoffwechselt und steht so dem Neuron für eine erneute Glutamat-Synthese via Phosphat-aktivierter Glutaminase (PAG) zur Verfügung. Des Weiteren wird Glutamat in α -Ketoglutarat (α -KG), ein Metabolit des Citratzyklus (TCA Zyklus), umgewandelt und steht so dem oxidativen Metabolismus zur Verfügung. Der inhibierende Neurotransmitter GABA führt zur Stabilisierung des Ruhepotentials, wodurch die Nervenzelle weniger erregbar ist. Ein Großteil des GABA wird zum einen selbst vom Neuron wieder aufgenommen, ein geringerer Teil wird zum anderen in den Astrozyten aufgenommen und über Succinat und α -KG zu Glutamat recycelt. Glutamatdehydrogenase/Aspartat-Aminotransferase (GDH/AAT), Glutamatdecarboxylase (GAD), GABA-Transaminase/Succinat-Semialdehyddehydrogenase (GABA-T/SSADH). Copyright ©2006, American Society for Neurochemistry, leicht modifiziert.

Eine weitere Konsequenz der Glutamat-Aufnahme ist, dass anaerobe Glykolyse in Astrozyten stimuliert wird, wodurch Glukose abgebaut und Laktat produziert wird. Treibende Kraft dafür ist eine Na^+ -Akkumulation im Astrozyten aufgrund des Na^+ /Glutamat-Co-Transportes (1 Glutamat-Molekül + 3 Na^+ -Ionen), wodurch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase erhöht wird und somit auch der ATP-Verbrauch. Dieser Prozess stellt einen direkten Mechanismus zwischen neuronaler Aktivität und Glukosennutzung dar (Pellerin et al. 1994) und wird als Astrozyt-Neuron Laktat Shuttle Hypothese (ANLSH) bezeichnet (Kasischke 2008). Mehrere Arbeitsgruppen befassten sich mit dieser Hypothese und bewiesen in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Versuchsansätzen, dass Laktat eine bevorzugte Energiequelle für neuronale Aktivität ist. Eine sehr detaillierte und exzellente Zusammenfassung ist in dem Review von Stobart und Anderson nachzulesen (Stobart et al. 2013). Neurone, als hoch-energetische Zellen, sind jedoch nicht in der Lage Energiesubstrate in Form von Glykogen zu speichern. Astrozyten dagegen sind in der Lage geringe Mengen an Glykogen als Energiesubstrat zu speichern, welches sie, im Falle eines erhöhten Energiebedarfs, für die neuronale OXPHOS via Glykolyse in Pyruvat und Laktat verstoffwechseln können (Barros 2013).



17

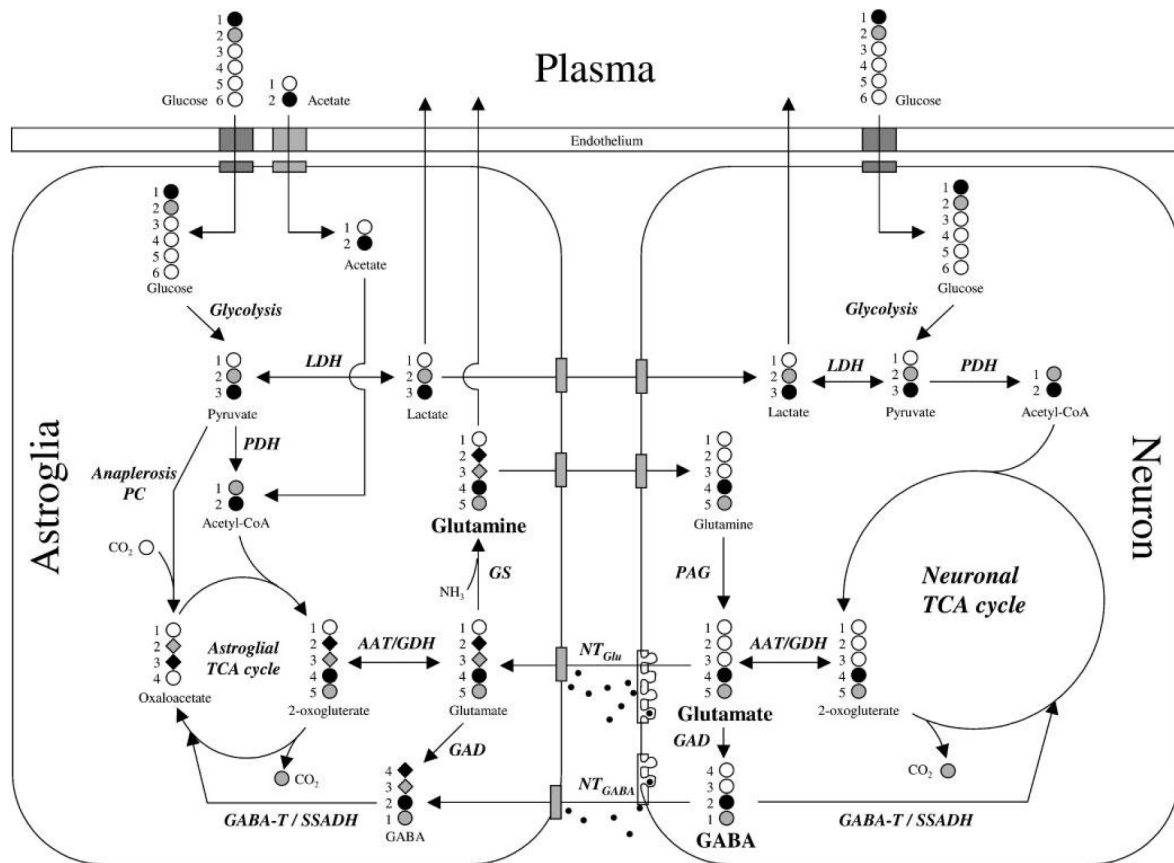


Abbildung 7: Übersicht des zerebralen Metabolismus im Neuron und Astrozyten nach Infusion von $[1-^{13}\text{C}]$ markierter Glukose bzw. $[2-^{13}\text{C}]$ markiertem Acetat und deren Verstoffwechselung in Metabolite. Schwarze und graue Markierungen symbolisieren das jeweilige ^{13}C -markierte Kohlenstoffatom im Metaboliten. Vierecke symbolisieren den ^{13}C -Einbau in Citratzyklus-Metabolite via dem astrozytären Pyruvat-Carboxylase (PC)-Weg von Pyruvat zu Oxalacetat (anaplerotische Reaktion). Bild aus de Graaf et al. (2003). Laktatdehydrogenase (LDH), Pyruvatcarboxylase (PC), Pyruvatdehydrogenase (PDH), Glutamatdehydrogenase/Aspartat-Aminotransferase (GDH/AAT), Glutamatdecarboxylase (GAD), Glutaminsynthase (GS), GABA-Transaminase/Succinat-Semialdehyddehydrogenase (GABA-T/SSADH), Phosphat-aktivierte Glutaminase (PAG), GABAerge Neurotransmission (NT_{GABA}), glutamaterge Neurotransmission (NT_{Glu}).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Konstitutiv *Mct8*-defiziente Mäuse replizieren den abnormalen Schilddrüsenhormonphänotyp (erhöhte T3-, erniedrigte T4- und normale bis leicht erhöhte Tsh-Konzentrationen), aber nicht den neurologischen, wie er in AHDS-Patienten beobachtet wird. Zudem zeigen Verhaltensstudien, dass das Gehirn dieser Mäuse nicht in einem global hypothyreoten Zustand ist, sondern auch in spezifischen Gehirnarealen hyperthyreote Merkmale aufweist. Dies verdeutlicht, dass eine zelluläre und ortsspezifische Regulation durch SDH bei Abwesenheit von *Mct8* vorliegt. Um den neurologischen Phänotyp besser zu verstehen, wird die Komplexität des Gehirns mit all seinen Zelltypen berücksichtigt. Dazu wurde ein Neuron-spezifisches *Mct8*-defizientes Mausmodell (*CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*) generiert und in dieser Arbeit die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse, die zerebrale Genexpression sowie der Energiestoffwechsel

im Gehirn dieser Mäuse untersucht. Zum Vergleich wurden gleichalte konstitutiv *Mct8*-defiziente Mäuse herangezogen.

Es liegt die Vermutung nahe, dass eine Repression des Energiestoffwechsels in *MCT8*-Defizienz zu den sprachlichen und motorischen Funktionseinschränkungen in betroffenen Patienten führt. Um diese Hypothese zu untersuchen, soll in Kooperation mit Prof. Juan Bernal (Madrid, Spanien) mittels NMR Messungen die Nutzung von Glukose im Gehirn in *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen *in vivo* untersucht werden. Die Analysen des Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mausmodells sollen helfen die Rolle von *Mct8*, nebst einer funktionalen Blut-Hirn-Schranke, im zerebralen Energiestoffwechsel genauer zu analysieren.

Um die beobachteten Änderungen im komplexen *Mct8*-defizienten Gehirn besser zu deuten, werden primäre Wildtyp- und *Mct8*-defiziente Astrozyten- und Neuronkulturen bezüglich einer SDH-abhängigen Regulation des Energiestoffwechsels mit Hilfe des *Seahorse XF^e Flux Analyzer* parallel zu den *in vivo* Studien *in vitro* untersucht. Definierte Serum-freie Kulturmedien erlauben zudem eine Variation der SDH-Konzentrationen (0nM, 3nM und 10nM T3 bzw. T4) in Anwesenheit von BSA als SDH-Bindeprotein. Mögliche Änderungen der mitochondrialen Atmungskette werden auf RNA- und Proteinebene nach Langzeitkultivierung von fünf Tagen mit den verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen wichtiger Komplexuntereinheiten analysiert.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Geräte

Analysewaage	Sartorius (Göttingen)
Autoklav Varioklav	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss (Oberkochen)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
CFX Connect™ Real Time System	Bio-Rad (München)
DELFI PlateShake	Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim)
Dismembrator	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories (München)
Gamma-Counter, Wallac 1470	Perkin Elmer (Massachusetts, USA)
Inkubator HERAcell®	Heraeus Holding (Hanau)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Holding (Hanau)
Leica CM 3000 Kryostat	Leica (München)
Mastercycler® Gradient	Eppendorf (Hamburg)
Mikroplatten Reader infinite M200 Pro	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Netzgerät EPS 601 Power Supply	Amersham Biosciences (Freiburg)
pH-Meter inoLab Benchtop	WTW (Weilheim)
Photometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe acu-jet pro	A. Hartenstein (Würzburg)
Präparierbesteck	FST Fine Tools GmbH (Heidelberg)
Rotarod for Mice 7650	UGO Basile (Varese, Italien)
Röntgenfilmkassette	Kodak (Rochester, USA)
Safe 2010 Laminair	Heto-Holten (Allerød, Dänemark)
Seahorse XF ^e Flux Analyzer	Seahorse Bioscience (Massachusetts, USA)
SDS-PAGE System	Bio-Rad Laboratories (München)
Transferblotapparatur Trans Blot SD	Bio-Rad Laboratories (München)
Ultraschallstab Labsonic M	B. Braun Biotech (Melsungen)
UV-Transilluminator V-90M	Benda (Weisloch)
Waage CP2201-OCE	Sartorius (Göttingen)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Die üblichen, für den Laborbedarf verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Herstellern bzw. Vertrieben bezogen: A. Hartenstein (Würzburg), Bio-Rad Laboratories (München), Life Technologies (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht), Seahorse Bioscience (Massachusetts, USA), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) und VWR International (Hannover).

Verbrauchsmaterialien und Medien für die Zellkultur wurden bei folgenden Herstellern bzw. Vertrieben erworben: Biochrom (Berlin), Life Technologies (Darmstadt) und TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Schweiz).

2.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Die, für die Versuche, verwendeten Chemikalien wurden in den höchsten verfügbaren Reinheitsgraden bei folgenden Herstellern bzw. Vertrieben erworben: Bio-Rad Laboratories (München), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostik (Mannheim), Serva Feinbiochemika (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim) und VWR International (Hannover).

Radioaktive Reagenzien wurden ausschließlich über Perkin Elmer (Massachusetts, USA) bezogen.

2.2.2 Vorgefertigte Reagenziensysteme

Absolute qPCR SYBR Green Fluorescein Mix	ThermoScientific, UK
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, UK
Aurum TM Total RNA Mini Kit	Bio-Rad Laboratories, München
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, München
LSAB+, Dako Detection System	Glostrup, Dänemark
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad Laboratories, München
M.O.M. Kit	Vector, Burlingame USA
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	Life Technologies, Darmstadt
Vectastain ABC Kit	Vector, Burlingame, USA

2.2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 22 unter Angabe der Sequenz aufgelistet. Diese wurden von der Firma Life Technologies (Darmstadt) synthetisiert.

2.2.4 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle 2 gelistet.

Tabelle 2: Zusammenfassung aller verwendeten Antikörper und deren Verdünnung in verschiedenen Methoden

Antikörper	Verdünnung Western Blot	Verdünnung Immunhistochemie	Firma
Primäre Antikörper			
rabbit α -Mct8	1:500	1:250	Atlas, Schweden
rabbit α -Parvalbumin		1:2000	Swant, Schweiz
mouse α -Calbindin		1:1000	Swant, Schweiz
rabbit α -Calretinin		1:4000	Swant, Schweiz
mouse α -NeuN		1:1000	Millipore, Darmstadt
mouse α -Gad65		1:2500	Chemicon®
mouse α -Gad67		1:2500	Chemicon®
rabbit α - β -Aktin	1:2000		Rockland, USA
Total OXPHOS Rodents	1:250 (Proben nicht aufkochen!)		Abcam, Großbritannien
Sekundäre Antikörper			
Cy3 TM goat α -mouse IgG	1:1000		Jackson Immuno Research, USA
Cy5 TM goat α -rabbit IgG	1:1000		Jackson Immuno Research, USA

2.3 Software und Datenbanken

Tabelle 3: Zusammenfassung aller verwendeten Software und Datenbanken

Software	
Axio Vision Rel 4.7	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)
EndNote X7.4	Thomson Reuters (New York, USA)
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Prism Software (San Diego, CA/USA)
Bio-Rad iCycler CFX Manager 3.1	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA/USA)
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)
Primer 3 Version 4.0	http://frodo.wi.mit.edu

Tabelle 3: Zusammenfassung aller verwendeten Software und Datenbanken

Software	
Wave Seahorse XFe Instrument Controller und Desktop Version	Seahorse Bioscience (Massachusetts, USA)
Datenbanken	
Allen Brain Atlas	http://www.brain-map.org
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu

2.4 Mauslinien, Mauszucht und Maushaltung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden in den Tierhaltungen der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin nach Vorgaben der lokalen Behörden (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin) gehalten und gezüchtet. Wasser und Futter standen dabei *ad libitum* zur Verfügung und der Tag/Nacht Rhythmus (12h/12h) wurde automatisch kontrolliert.

Die globale *Mct8*-defiziente Mauslinie wurde von der Firma Deltagen (San Mateo, CA, USA) hergestellt und bezogen. Zuchten erfolgten immer im gleichen Verpaarungsschema: ein Wildtyp-Männchen wurde mit einem heterozygoten Weibchen verpaart, wobei folgende Nachkommen erhalten wurden: Wildtyp (*Mct8*^{+/y}) und *Mct8* knockout (*Mct8*^{-y}) Männchen sowie Wildtyp (*Mct8*^{+/+}) und heterozygote (*Mct8*^{+/-}) Weibchen. Somit erhielt man aus einem Wurf Kontrolltiere und männliche *Mct8*-defiziente Tiere.

Für Untersuchungen an primären kortikalen Neuronkulturen wurden heterozygote *Mct8*-defiziente Weibchen in der FEM terminiert verpaart und zum Gestationszeitpunkt E14 geliefert. Die gefloxe *Mct8*-Maus (*Mct8*^{fl/fl}) wurde von EUCOMM bezogen (ausführliche Stammbezeichnung: *Slc16a2*^{tm1a(Komp)Wts}). Zur Generierung des Knockout-Allels wurde in Exon 2 eine LacZ/Neo-Kassette inseriert. Die Abbildung 8 A zeigt schematisch die Vektorkarte. Das Design des Vektors ermöglicht einen sog. *Knock-out first allele* mit einer *promotor-driven cassette*: Nach Rekombination mit einer FLP-Rekombinase (erkennt FRT-Stellen) wird dieses Allel in ein konditionelles Allel umgewandelt und es verbleiben lediglich zwei loxP-Stellen im Organismus, welche das dritte Exon flankieren. Diese können von einer

Cre-Rekombinase erkannt werden. Dadurch kommt es bei erfolgreicher Cre-Rekombination zur Translation eines trunkierten Proteins und somit zum Abbau dieses. Ebenfalls gekennzeichnet in der Vektorkarte sind die Stellen, an denen die Typisierungsprimer (Slc16a2_4111_fwd/rev) binden und je nach Genotyp eine Unterscheidung nach Wildtyp (WT, 410 bp), heterozygot ($Mct8^{+/fl}$, 410 bp + 525 bp) und knockout ($Mct8^{fl/y}$, 525 bp) möglich machen (Abbildung 8 A und B).

Die CamKII α -Cre-Mauslinie wurde von Prof. Schütz (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) bezogen. Diese Cre-Rekombinase, welche unter der transkriptionellen Kontrolle des CamKII α -Promotors steht, ermöglicht nach Verpaarung mit geflochten Mäusen, einen spezifischen knockout in neuronalen Zellpopulationen in Cortex, Hippocampus und Amygdala sowie zu geringerer Intensität in Striatum und Hypothalamus (Casanova et al. 2001). Die Abbildung 8 B zeigt das nach Typisierung erhaltene Bandenmuster zur Identifikation CamK-Cre-positiver (345 bp) Mäuse, wobei eine interne Kontrolle des CamKII-Locus (290 bp) mitgeführt wurde. Durch die Verpaarung eines Cre-negativen geflochten Männchen ($Mct8^{fl/y}$) mit einem Cre-positiven heterozygoten geflochten Weibchen ($CamK-Cre; Mct8^{+/fl}$) wurden sowohl männliche als auch weibliche Wildtyp (WT) Kontrollen und Neuron-spezifische $Mct8$ -defiziente Mäuse ($CamK-Cre; Mct8^{fl/y}$ bzw. $CamK-Cre; Mct8^{fl/fl}$) in einem Wurf generiert. Alle verwendeten Mauslinien wurden auf dem C57BL/6 Background gezüchtet und verpaart.

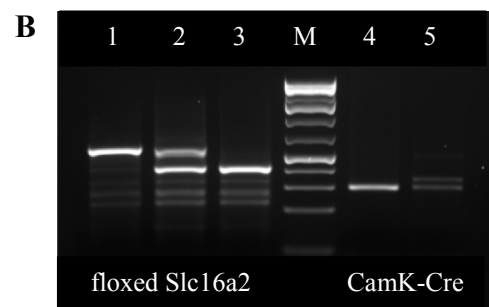
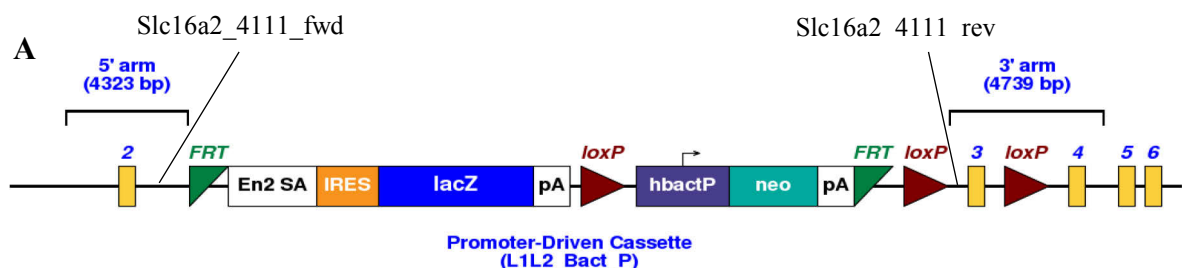


Abbildung 8: A) Vektorkarte „ $Mct8$ Knock-out first allele“ (promotor driven) von EUCOMM (<https://www.komp.org/ProductSheet.php?cloneID=55768>). Nach Rekombination mit einer FLP-Rekombinase wird dieses Allel in ein konditionales Allel umgewandelt und es verbleiben zwei loxP-Stellen im Organismus, welche Exon 3 des $Mct8$ -Gens flankieren. Zudem sind die Primerbindestellen (Slc16a2_4111_fwd/rev) für Genotypisierungen gekennzeichnet. B) Genotypisierung $CamK-Cre; Mct8^{fl/y}$ -Mäuse. 1: $Mct8^{fl/y}$ (525 bp), 2: $Mct8^{+/fl}$, 3: Wildtyp (410 bp), 4: CamK-Cre negativ, 5: CamK-Cre positiv, M: DNA-Marker

2.5 Rotarod

Rotarod-Analysen wurden zur Untersuchung motorischer Störungen bei Mäusen durchgeführt. Als zu bewertender Parameter galt die Zeit, welche eine Maus auf einem rotierenden Stab mit

ansteigender Drehzahl bis zum Fall verbringt. Es wurden fünf Läufe bis maximal 5 Minuten nacheinander durchgeführt, wobei zwischen jedem Lauf vier Minuten Pause eingehalten wurden.

2.6 Gewinnung von murinem Probenmaterial

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte gemäß ihres Alters nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Tiere ab dem 20. Lebenstag wurden durch zervikale Dislokation getötet, jüngere Tiere direkt durch Dekapitation. Vollblut wurde durch Anschneiden der rechten Herzkammer gesammelt, bis zur Gerinnung auf Eis gelagert und mittels Zentrifugation bei 10.000xg, 4°C für 10 min das Serum gewonnen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Um das restliche Blut aus dem Körper der Maus zu spülen, wurden diese nach der Blutentnahme mit 20 ml 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (PB) über die linke Herzkammer perfundiert, die Zielorgane zügig entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung (RNA, Protein) bei -80°C gelagert. Um Proteine oder RNA aus Geweben gewinnen zu können, erfolgte die Pulverisierung unter Verwendung eines Dismembrators. Die Organe und benötigten Hilfsmittel wurden über die gesamte Aufarbeitungsdauer auf Trockeneis bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Organ wurde in ein vorgekühltes Teflongefäß mit einer Zertrümmerungskugel überführt, in den Dismembrator eingespannt und bei 2000 rpm für 1 min pulverisiert und bei -80°C gelagert. Organe, welche für immunhistochemische Versuche verwendet wurden, wie zum Beispiel Gefrierschnitte des Gehirnes, wurden nach Perfusion über Nacht in 4% Paraformaldehyd/PB (PFA) fixiert und anschließend in 30%ige Saccharoselösung überführt (Kryoprotektion). Das Durchfrieren kryoprotektierter Gehirne erfolgte in Multiwell-Platten auf Trockeneis und deren Lagerung bei -80°C. Schilddrüsen wurden über Nacht in 4% PFA/PB zur Fixierung gelagert und am Folgetag, bis zur Einbettung in Paraffin, in 0,1 M Phosphatpuffer überführt und bei 4°C gelagert.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolation genomischer DNA zur Genotypisierung verschiedener Mauslinien

Die Genotypisierung der Nachkommen der *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*- und *Mct8*-Mauszuchten erfolgte mittels Biopsien der Ohrlochmarkierung oder Schwanzspitze. Diese wurden in 100 µl alkalischem Lysepuffer (Chomczynski et al. 2006) für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei

4°C inkubiert und von dieser Lösung direkt 1µl in die PCR-Reaktion (siehe Tabelle 4) eingesetzt. Für die Typisierung von Mausembryonen für primäre neuronale Zellkulturen wurden Reste des Gehirns nach Präparation ebenfalls für 1 Stunde in 100µl Lysepuffer bei RT inkubiert und vor der PCR noch einmal 1:100 in dH₂O verdünnt. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die PCR-Reaktionen erfolgten nach Optimierung für jedes spezifische Gen in einem Thermocycler (Tabelle 4, beispielhaft für Amplifikation des geflochtenen *Mct8*-Gens). Die Auftrennung der PCR-Fragmente wurde anschließend in einem 1,5%igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel in Natriumborat-Puffer überprüft.

Tabelle 4: Ansatz für eine Genotypisierungs-PCR Reaktion der *Mct8^{fl/fl}*-Mauslinie

Komponenten	Reaktionsvolumen [µl]	Programm
DNA	1,0	94°C – 4 min 94°C – 30 sec 63°C – 50 sec 72°C – 1 min 72°C – 3 min } 35x
10xPuffer + MgCl ₂	3,0	
10mM dNTPs	1,5	
10µM Slc16a2_4111_fwd - Primer	1,0	
10µM Slc16a2_4111_rev - Primer	1,0	
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1	
dH ₂ O	auf 30,0 µl	

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Genotypisierungsprimer mit entsprechender Sequenz. Fwd = vorwärts, rev = rückwärts

Primer	Primersequenz (5' → 3')
Slc16a2_4111_fwd	AAGTGCTGAGCCATCTTCCC
Slc16a2_4111_rev	AGATGTGTACCACCACCCCC
CamK_Primer A	GGTTCTCCGTTTGCACTCAGGA
CamK_Primer B	CCTGTTGTTCAGCTTGCACCAG
CamK_Primer C	CTGCATGCACGGGACAGCTCT
Mct8_3195_fwd	GGGCCAGCTCATTCCTCCCCTCAT
Mct8_35602_rev	TGTGAGTATATTCAGTACCGTTTG
Mct8_35603_rev	CAATTCAATGGTCAAAGCAGGACTG

2.7.2 RNA Isolierung

Ziel dieser Methode war es, aus zuvor kultivierten Zellen oder diversen Mausgeweben (Hypophysen-, Cortexpulver, etc.) die Gesamt-RNA zu isolieren. Hierfür wurde das *Aurum*TM

Total RNA Mini Kit von Bio-Rad verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elution der RNA erfolgte in 40µl für primäre Zellen bzw. 80µl für Gewebe in Elutionspuffer und konnte bei -80°C für längere Zeit gelagert werden.

2.7.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung isolierter DNA bzw. RNA erfolgte mit Hilfe des *NanoDrop*. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm, was dem Absorptionsmaximum von DNA und RNA entspricht. Die Quotienten 260/280 und 260/230 wurden als Parameter für die Reinheit der Nukleinsäuren berücksichtigt.

2.7.4 Reverse Transkription von RNA zu cDNA

Das Prinzip der Reversen Transkription beruht auf der Synthese des komplementären cDNA-Strangs (complementary DNA) zu zuvor isolierter RNA (siehe 2.7.2) mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV-RT). Hierfür wurde das Kitsystem *iScript cDNA Synthesis* von Bio-Rad verwendet. Der so erzeugte RNA-DNA-Hybrid wurde als Ausgangsmaterial für Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Real Time PCR genutzt (siehe 2.7.5). Die Erststrangsynthese erfolgte in folgendem Ansatz und Programm (Tabelle 6) im Thermocycler. Gelagert wurde die cDNA bei -20°C.

Tabelle 6: Ansatz für Erststrangsynthese von cDNA aus RNA und dazugehöriges Programm

Komponenten	Reaktionsvolumen [µl]	Programm
5x iScript Reaction Mix	4,0	25°C – 5 Minuten 42°C – 30 Minuten 85°C – 5 Minuten
iScript Reverse Transcriptase	1,0	
500 ng RNA	X	
Nuklease-freies Wasser	auf 20,0 µl	

2.7.5 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Für die Analyse spezifischer Genexpressionen in Geweben oder Zellen wurde die qPCR genutzt. Hierzu wurden die in Tabelle 22 angegebenen Gen-spezifischen Primer verwendet. Die Durchführung beruht auf der SYBR Green Methode, bei der dem Reaktionsansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugegeben wird, welcher in die neu-synthetisierte DNA interkaliert und bei Anregung fluoresziert. Somit steigt die Zunahme der Fluoreszenz proportional mit der Zunahme der neu-synthetisierten DNA über den Messverlauf, welche am

Ende der Elongationszeit jedes Zyklus im iCycler detektiert wurde. Als Maß für die Quantifizierung galten hierbei die mittels Software *CFX Manager 3.1* ermittelten Ct-Werte (*cycle of threshold*) eines Kontrollgens (18S als *housekeeping gene*) sowie des zu untersuchenden Gens. Änderungen der Genexpression wurden schließlich mit der Δ Ct- oder $\Delta\Delta$ Ct-Methode berechnet. Zum Test der Primerspezifität wurde bei erster Verwendung eine Schmelzkurve mitgeführt und das PCR-Produkt, zur Überprüfung der Fragmentgröße, in einem Agarosegel aufgetrennt. Der Reaktionsansatz sowie das Messprotokoll sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Ansatz für eine quantitative Real-Time PCR und dazugehöriges Programm

Komponenten	Reaktionsvolumen [μ l]	Programm
SYBR Green Mix	12,5	95°C – 15 min
10 μ M Vorwärtsprimer	0,25	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> 95°C – 30 sec 62°C – 45 sec 72°C – 30 sec </div> <div style="font-size: 3em; margin-right: 10px;">}</div> 40x </div>
10 μ M Rückwärtsprimer	0,25	
500 ng cDNA	5,0	
dH ₂ O	auf 25,0 μ l	72°C – 3 min

2.8 Zellbiologische Methoden

Alle primären Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Verwendete Medien und deren Zusammensetzung sind der Tabelle 8 und Tabelle 9 zu entnehmen. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.8.1 Isolierung und Kultivierung primärer Astrozytenkulturen

Primäre Astrozyten wurden von Jungtieren aus der Zucht *Mct8*-defizienter Mäuse im Alter von 1 bis maximal 3 Tagen isoliert. Aufgrund des postnatalen Stadiums werden mit der hier durchgeführten Methode auch Mikroglia isoliert und kultiviert, was zu einer 90-95% reinen Astrozytenkultur führte. Zunächst wurden die Tiere mittels Dekapitation getötet, das Gehirn frei gelegt und in eine Petrischale, befüllt mit eiskaltem HBSS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺), überführt. Unter einem Stereomikroskop wurden die zwei Großhirnhälften jedes Tieres frei von Meningen präpariert und bis zur Aufarbeitung in 2 ml kaltem HBSS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺) auf Eis gelagert. Für Genotypisierungen jedes einzelnen Jungtieres diente eine Schwanzspitzenbiopsie (siehe 2.7.1). Unter sterilen Bedingungen erfolgte die weitere Isolierung der Zellen. Die Großhirnhälften wurden mit 1ml 10x Trypsin/EDTA für 10 min bei 37°C versetzt und verdaut.

Der Prozess wurde mit Astrozytenmedium (siehe Tabelle 8) abgestoppt und das anverdaute Gewebe mit einer serologischen Pipette trituriert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation (500 rpm, 1 Minute) zur Trennung der Zellen (Überstand) von groben Gewebeteilen (Boden). Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Gefäß überführt, nochmals bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 5 ml Astrozytenmedium resuspendiert und über ein Zellsieb (Porengröße: 70 µm) filtriert. Die gewonnene Zellsuspension wurde in einem Gesamtvolumen von 12 ml in Zellkulturflaschen (75 cm² Wachstumsfläche) ausgesetzt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um tote Zellen zu entfernen. Die Astrozyten wurden ohne weitere Medienwechsel bis zu 21 Tage in Kultur gehalten.

Nach dreiwöchiger Kultivierungszeit erfolgte die Aussaat der Zellen in Poly-L-Lysin (PLL)-beschichtete Multiwell-Platten. Um Mikroglia zu entfernen, wurden zunächst die Astrozyten bei 500 rpm und 37°C für 4 Stunden geschüttelt und anschließend zweimal mit 1xPBS gewaschen. Nach Inkubation in 1 ml 1x Trypsin/EDTA im Brutschrank für 10 min erfolgte die Zugabe von 9 ml Medium und Resuspension der Zellen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden die ersten 48 Stunden in Astrozytenmedium kultiviert. Anschließend erfolgte ein 100%iger Mediumwechsel gegen ein definiertes, serumfreies Astrozytenmedium (siehe Tabelle 8). Nach weiteren 3 Tagen erfolgte ein nochmaliger 50%iger Mediumwechsel. Für Analysen der mitochondrialen Atmung im *Seahorse XF^e Flux Analyzer* wurden 50.000 Zellen/well in PLL-beschichtete 96 well Seahorse XF^e Zellkulturplatten ausgesetzt und für weitere 7 Tage kultiviert, wobei nach 2 Tagen auf das definierte Medium umgestellt wurde. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden 5.000 Zellen auf sterile, PLL-beschichtete Glasplättchen in einer 12 well Platte ausgesetzt und bis zu 7 Tage kultiviert und anschließend mit 4% PFA fixiert. Die Lagerung fixierter Astrozyten erfolgte in 1xPBS bei 4°C. Für radioaktive T3-Aufnahme Experimente wurden die frisch isolierten Zellen direkt in 12 well Platten (Triplikate/Messpunkt) ausgesetzt und bis zur Konfluenz im Inkubator bei 37°C im Astrozytenmedium kultiviert.

Tabelle 8: Zusammensetzung Zellkulturmedien für primäre Astrozytenkulturen

Mediumtyp	Zusammensetzung
Astrozytenmedium	DMEM (4,5 g/l D-Glukose, L-Glutamin, 110 mg/l Natriumpyruvat), 10% FBS, 1% Penicillin (10 U/µl)/Streptomycin (10µg/µl), 0,1% 50 mM β-Mercaptoethanol

Tabelle 8: Zusammensetzung Zellkulturmedien für primäre Astrozytenkulturen

Mediumtyp	Zusammensetzung
serumfreies Astrozytenmedium	1,5 µg/ml Fibronektin (bovine plasma), 5 ng/ml bFGF, 0,5 µg/ml Heparan-Sulfat, 10 ng/ml EGF (recombinant mouse), 50 µg/ml Transferrin (human), 5 µg/ml Insulin, 30 nM Natrium-Selenit, 3 nM T4, 2,5 mg/ml BSA in DMEM/F-12 (mit L-Glutamin), (modifiziert nach (Wu et al. 2010))

2.8.2 Isolierung und Kultivierung primärer kortikaler Neuronkulturen

Primäre Neuronkulturen wurden von Embryonen der Nachzucht *Mct8*-defizienter Mäuse zum Gestationszeitpunkt E15.5 gewonnen. Spätere Entwicklungsphasen führten zu einem Verlust vitaler Zellen und zudem zur Anreicherung weiterer Zelltypen (z.B. Astrozyten).

Das schwangere Muttertier wurde mittels Genickbruch getötet. Nach Öffnung des Bauchraumes und Präparation des Uterus wurden die Embryonen in eine mit eiskaltem Neurobasal Medium (NBM) befüllte Petrischale überführt. Nach Dekapitation der Embryonen wurden ausschließlich die Cortexhälften jedes Embryos frei von Meningen unter einem Stereomikroskop präpariert und in einem Reaktionsgefäß, befüllt mit 900 µl NBM-Medium, bis zur Isolierung der Zellen auf Eis gelagert. Für Genotypisierungen jedes einzelnen Embryos dienten Teile des Gehirns, die nach Präparation des Cortexes übrig waren (siehe 2.7.1). Unter sterilen Bedingungen erfolgte die weitere Isolierung der Zellen. Die Cortexhälften wurden mit 100µl 1x Trypsin/EDTA versetzt und für 10 min bei 37°C und gelegentlichem Mischen anverdaut. Eine anschließende zweiminütige Inkubation auf Eis garantierte ein Absetzen des Gewebes, sodass der Überstand entfernt werden konnte. Die Cortexhälften wurden in 1 ml kaltem N-Medium (siehe Tabelle 9) trituriert und nochmals für zwei Minuten auf Eis inkubiert, was dem Absetzen grober Gewebeteile diente. Die Neuronen, welche sich im Überstand befinden, wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, auf Eis gelagert und mittels einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt. Neurone gleicher Genotypen wurden vereint und konnten, falls die Typisierungsergebnisse noch ausblieben, über Nacht im Kühlschrank in Startermedium (siehe Tabelle 9) gelagert werden. Hierzu wurden die Zellen bei 200xg, 4°C für 2 min zentrifugiert und in 1 ml Startermedium vorsichtig, aber effizient resuspendiert.

Die Aussaat der Zellen erfolgte ausschließlich in Startermedium, da das darin enthaltende Glutamat die Zelldifferenzierung anregt. Zudem wurden alle verwendeten Zellkulturplatten zweifach-beschichtet (PLL, 2,5 µg/ml und Kollagen G, 40 µg/ml), wobei das PLL über zwei

Tage im Kühlschrank wirkte und das Kollagenmedium (siehe Tabelle 9) mindestens zwei Stunden vor Zellaussaat auf 37°C inkubierte. Nach 2 Tagen wurde das Medium vollständig entfernt und durch ein definiertes, serumfreies Wachstumsmedium (siehe Tabelle 9) ersetzt. Nach weiteren 3 Tagen erfolgte ein nochmaliger 50%iger Mediumwechsel. Insgesamt können die Kulturen bis zu drei Wochen gehalten werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen erfolgten bereits nach sieben Tagen Kultivierungszeit. Für Analysen der mitochondrialen Atmung im *Seahorse XF^e Flux Analyzer* wurden 40.000 Zellen/well in PLL- und Kollagen G-beschichtete 96 well Seahorse XF^e Zellkulturplatten ausgesetzt und für weitere 7 Tage kultiviert. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden 200.000 Zellen auf sterile, PLL- und Kollagen G-beschichtete Glasplättchen in einer 12 well Platte ausgesetzt und nach 7 Tagen in Kultur mit 4% PFA fixiert. Die Lagerung fixierter Neurone erfolgte in 1xPBS im Kühlschrank.

Tabelle 9: Zusammensetzung Zellkulturmedien für primäre kortikale Neuronkulturen

Mediumtyp	Zusammensetzung
Startermedium	1x B27, 1x Penicillin/Streptomycin, 0,5 mM L-Glutamin, 1x Kanamycin, 25 µM Glutamat in NBM
N-Medium	10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10µg/ml Insulin, 10 mM HEPES, 0,8% Glukose in DMEM/F-12 (mit L-Glutamin)
Kollagenmedium	5% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 10 mM HEPES, 40 µg/ml Kollagen G in DMEM/F-12 (mit L-Glutamin)

Tabelle 9: Zusammensetzung Zellkulturmedien für primäre kortikale Neuronkulturen

Mediumtyp	Zusammensetzung
definiertes serumfreies Wachstumsmedium	0,1 µg/ml Biotin, 2 µg/ml L-Carnitin, 1 µg/ml Ethanolamin, 15 µg/ml D(+)-Galaktose, 16,1 µg/ml Putrescine, 20 ng/ml Corticosteron, 1,0 µg/ml Linolsäure, 1,0 µg/ml Linolensäure, 6,3 ng/ml Progesteron, 0,1 µg/ml Retinylacetat, 1 µg/ml DL-alpha-Tocopherol, 1 µg/ml DL-alpha-Tocopherylacetat, 2,5 mg/ml BSA, 2,5 µg/ml Katalase, 1,0 µg/ml Glutathion (reduziert), 4,0 µg/ml Insulin, 2,5 µg/ml Superoxiddismutase, 5,0 µg/ml Transferrin, 2,0 ng/ml T3, 14,4 ng/ml Natrium-Selenit, 0,4 µg/ml Zinksulfat, 1,3 ng/ml Kupfersulfat, 50 pg/ml Manganchlorid, 0,6 ng/ml Ammoniummetavanadat, 47 ng/ml Liponsäure in NBM (Roth et al. 2010a)

2.9 Proteinbiochemische Methoden

In der folgenden Tabelle 10 sind alle Puffer und Lösungen zusammengefasst, die für proteinbiochemische Methoden verwendet wurden.

Tabelle 10: Zusammenfassung aller verwendeten Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10% APS	10% APS (w/v) in dH ₂ O
Blockierungslösung	5% Magermilchpulver (w/v) in 1x PBS-T
20% Gellösung	162,3 ml Acrylamid, 65 ml Bisacrylamid, auf 250 ml dH ₂ O
Homogenisationspuffer	250 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA in dH ₂ O, pH 7,4
10x Laufpuffer SDS-PAGE	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1 % (w/v) SDS in dH ₂ O; für 1x Laufpuffer 1:10 Verdünnung in dH ₂ O
4x Laemmli-Probenpuffer	200 mM Tris pH 6,8, 40 % Glycerol, 16 % SDS, 20 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau in dH ₂ O
10x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ in 1 L dH ₂ O, pH 7,4; für 1x PBS 1:10 Verdünnung in dH ₂ O

Tabelle 10: Zusammenfassung aller verwendeten Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1x PBS-T	0,05 % Tween 20 in 1x PBS
Ponceau-Rot	0,1 % Ponceau-Rot in 5 % Essigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O
10x Transferpuffer Western Blot	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris in dH ₂ O
1x Transferpuffer Western Blot	100 ml 10x Transferpuffer, 100 ml Methanol, auf 1 L dH ₂ O
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS in dH ₂ O

2.9.1 Proteinextraktion

Eine Spatelspitze Gewebepulver (Leber, Cortex, etc.) wurde in ein auf Trockeneis vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Homogenisationspuffer (siehe Tabelle 10) + 1 mM DTT resuspendiert und lysiert. Kleine Organe, wie z.B. Hypophyse und Hypothalamus, wurden ohne Pulverisierung direkt in 80 µl Homogenisationspuffer + 1 mM DTT lysiert. Organe, welche für Western Blot Experimente genutzt wurden, wurden in Homogenisationspuffer ohne DTT resuspendiert. Der zusätzliche Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (10 Stöße mit einer Amplitude von 100 und einem Zyklus von 0,6). Eine Membranfraktion wurde durch Zentrifugation des Gesamtproteins bei 14.000 rpm, 4°C für 15 min angereichert. Der Überstand, in welchem sich überwiegend die zytosolische Fraktion befand, wurde in ein frisches Gefäß überführt, die Pelletfraktion (= Membranfraktion) wurde nochmals in 100 µl Homogenisationspuffer ± 1 mM DTT resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Proteine wurden bei -20°C gelagert.

2.9.2 Proteinbestimmung mittels Bradford und BCA

Die Proteinkonzentrationsmessung von Gewebeproben erfolgte nach Bradford (Bradford 1976). Die Proben wurden 1:1000 in 1 ml *Protein Assay Reagenz* (BioRad; 1:5 Verdünnung in dH₂O) in einer Einwegküvette verdünnt, gut durchmischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Durch das Mitführen einer Standardreihe (0-35 mg/ml BSA) konnte über deren Standardgerade der Proteingehalt der Probe berechnet werden. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten pro Probe. Der Proteingehalt in Zellen nach durchgeführtem Seahorse-Experiment wurde mittels einem *BCA Protein Assay Kit* von PierceTM gemessen. Die Zellen wurden direkt in der 96 well Platte durch einmaliges

Einfrieren-Auftauen und einer zusätzlichen Wasserlyse (75 µl/well und 5 minütigem Schütteln bei 900 rpm) aufgeschlossen. 25 µl der aufgeschlossenen Zellsuspension wurden mit 200 µl BCA Reagenz A + B (Reagenz A:B, 50:1) versetzt, für 30 sec bei 500 rpm gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit und einem Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur erfolgte die Messung im Platten-Photometer bei 592 nm. Durch das Mitführen einer BSA Standardreihe (0 – 2 mg/ml) konnte der Proteingehalt in der jeweiligen Probe berechnet werden.

2.9.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine analytische Methode, welche der Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes durch das Anlegen eines elektrischen Feldes dient. Die Wanderung in Richtung Anode wird durch das denaturierend wirkende Detergenz SDS gewährleistet, da dieses die Eigenladung der Proteine überlagert. Die Gele bestanden aus einem 12,5%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel (siehe Tabelle 11). Vor elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteinhomogenate in gewünschter Konzentration (meist 80 µg Protein/Gewebe) auf 15 µl mit dH₂O aufgefüllt, mit 5 µl 4x Laemmli-Probenpuffer (siehe Tabelle 10) versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte in einem SDS-PAGE System mit elektrophoretischen Kammern von Bio-Rad bzw. PEQLAB zunächst bei 80 Volt im Sammelgel für 30 Minuten und anschließend bei 120 Volt im Trenngel für ca. 60 min in Laufpuffer (siehe Tabelle 10). Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, Fermentas) mitgeführt.

Tabelle 11: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für eine SDS-PAGE

	Sammelgel 5%	Trenngel 12,5%
dH ₂ O	2 ml	1,25 ml
Sammelgelpuffer	1ml	-
Trenngelpuffer	-	2,5 ml
20% Gellösung	1 ml	6,25 ml
TEMED	4 µl	10 µl
10% APS	40 µl	100 µl

2.9.4 Western Blot und Immundetektion

Der im Anschluss an die SDS-PAGE durchgeführte Western Blot dient der Immobilisierung von Proteinen auf einer Nitrocellulose-Membran durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Angewandt wurde das *semi-dry* Verfahren in einem Trans Blot System bei 20 Volt und 250 mA für 30 bzw. 45 min (abhängig von der Gelgröße) in Transferpuffer (siehe Tabelle 10). Der Erfolg des Transfers wurde mittels Ponceau-Färbung der Membran kontrolliert. Hierfür wurde diese für 30 sec in Ponceau-Rot geschwenkt und mit Wasser gespült bis Banden sichtbar wurden.

Um die auf der Membran übertragenen Proteine sichtbar zu machen, wurde die Markierung relevanter Proteine mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Hierzu mussten zunächst unspezifische Bindestellen mithilfe von 5% Magermilch in PBS-T (w/v) für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler blockiert werden. Anschließend folgte die Inkubation der Membran mit einem spezifischen Primärantikörper, verdünnt in Blockierungslösung, über Nacht bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran für weitere 60 min bei RT geschwenkt, dreimal für 5 min mit PBS-T (0,5 %) gewaschen und mit einem Spezies-spezifischen, HRP-gekoppelten Sekundärantikörper verdünnt in Blockierungslösung, für 60 min bei RT schwenkend inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen in PBS-T konnte das gewünschte Protein mit dem *ECL Detection System* von Amersham (Chemilumineszenz-Reaktion basierend) auf einem Autoradiographie-Film detektiert werden. Die Belichtungszeit variierte von Antikörper zu Antikörper und musste deshalb für jede Entwicklung individuell ermittelt werden.

2.10 Histologische Methoden

In der folgenden Tabelle 12 sind alle Puffer und Lösungen aufgeführt, die für histologische Methoden verwendet wurden.

Tabelle 12: Zusammenstellung aller verwendeten Puffer und Lösungen für histologische Methoden

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Acetatpuffer	60 ml Natriumacetatlösung (2,7 %), 240 ml Essigsäure (1,2 %), pH 3,8
Einfriermedium	30 % (w/v) Glycerol, 30 % (v/v) Polyethylenglykol in 1x PBS
0,5% Kresylviolett-Lösung	1,5 g Kresylviolett-Acetat in 300 ml Acetatpuffer

Tabelle 12: Zusammenstellung aller verwendeten Puffer und Lösungen für histologische Methoden

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ in 1 L dH ₂ O, pH 7,4; für 1x PBS 1:10 Verdünnung in dH ₂ O
1x PBS-T	0,4 % (w/v) Triton X-100 in 1 x PBS
0,2 M Natrium-Phosphatpuffer (PB)	80% (v/v) 0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 20% (v/v) 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4; Verdünnungen in dH ₂ O
10% Pferdeserum	10% Pferdeserum (v/v)
30% Saccharose-Lösung	30% Saccharose (w/v) in 0,1 M PB

2.10.1 Nissl-Färbung kryoprotektierter Gehirnschnitte

Präparate kryoprotektierter Gehirne wurden am Kryostat (-22°C Kammertemperatur) mit einer Schnittdicke von 35 µm angefertigt und in 1xPBS (pH 7,4) bis zur Verwendung bei 4°C oder in Einfriermedium (siehe Tabelle 12) bei -20°C gelagert bzw. ausgewählte Schnitte direkt auf gelatinierte Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Mithilfe von einer Kresylviolett-Lösung (siehe Tabelle 12) erfolgte das Anfärben basophiler Strukturen. Abgestoppt wurde die Reaktion durch mehrmaliges Spülen in Acetatpuffer (siehe Tabelle 12). Über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol (1x 2min 40% Ethanol, 1x 2 min 70% Ethanol, 2x 2min 96% Ethanol, 2x 2min 100% Ethanol, 2x 5 min Xylol) wurde das Wasser aus dem Gewebeschnitt entzogen und letztendlich mit Entellan eingedeckt. Diese Methode wurde einerseits als Übersichtsfärbung genutzt und zum Anderen zu Hilfe gezogen, um möglichst identische Schnittebenen von Wildtyp- und Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Gehirnen im Vergleich für weitere immunhistochemische Färbungen zu nutzen.

2.10.2 Peroxidase-Färbung von *free floating* Gehirnschnitten

Für Antikörper (AK)-basierte Biotin-Streptavidin-Peroxidase Färbungen von kryoprotektierten Gehirnschnitten wurden zwei verschiedene Kitsysteme (Dako und Vectastain ABC Kit) nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation mit 0,3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung für 10 min blockiert und anschließend die Schnitte dreimal für 5 min mit 1xPBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen erfolgte eine Inkubation für 1h mit Blockierungsserum bei Raumtemperatur. Die Inkubation des Primärantikörpers, verdünnt in Blockierungsserum, erfolgte über Nacht bei 4°C. Die

Verdünnung des jeweiligen Primär-AK wurde vorher individuell ausgetestet. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte dreimal 5 min gewaschen und für eine weitere Stunde in biotinyliertem Sekundär-AK bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Inkubation der Schnitte mit einem Streptavidin-HRP-Komplex zur Signalverstärkung für 1h bei RT und anschließend, nach erneutem Waschen, die Färbung der Schnitte mit DAB-Chromogen (1:50 Verdünnung in DAB-Puffer). Dabei wurde die Intensität der Färbung unter dem Mikroskop verfolgt und so für jeden verwendeten Antikörper individuell die Länge der Färbezeit bestimmt und durch Waschen mit 1xPBS gestoppt. *Free floating* Schnitte wurde auf Objektträger aufgezogen, und nach dem Trocknen über eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol (siehe 2.10.1) entwässert und mit Entellan eingedeckt.

2.10.3 Fluoreszenz-Färbung von Zellen und Gehirnschnitten

Die Immunfluoreszenz dient der Detektion mittels Fluoreszenz-markierter Sekundär-Antikörper (AK) von relevanten Proteinen in Geweben und Zellen. Die durchgeführte Methode erlaubte den Einsatz von zwei unterschiedlichen Primär- und Sekundär-AK, wobei sich die Sekundär-AK in ihrer Fluoreszenz-Markierung (Cy3, Cy5) unterschieden und gegen einen der Organismen richteten, in welchem der Primär-AK hergestellt wurde (Maus oder Kaninchen). Die folgende beschriebene Durchführung wurde sowohl für Zellen als auch Kryo-Gehirnschnitte angewendet. Primäre Zellen wurden wie unter 2.8.1 beschrieben ausgesetzt und mit PFA fixiert. Präparate kryoprotektierter Gehirne wurden am Kryostat mit einer Schnittdicke von 35µm angefertigt und in 1xPBS bis zur Verwendung bei 4°C oder in Einfriermedium (siehe Tabelle 12) bei -20°C gelagert. Für die Durchführung wurde speziell bei der Verwendung von primären und sekundären Maus-AK auf Mausgewebe und -zellen das *M.O.M. Kit* von Vector (Burlingame, USA) verwendet, um unspezifische Hintergrundsignale weitestgehend zu unterbinden. Alle Waschschriffe erfolgten in 1x PBS + 0,4% Triton X-100 + 0,1 M Glycin (PBS-T/Glycin) bei RT auf einem Schüttler. Nach der Fixierung wurden die Zellen bzw. Kryo-Gehirnschnitte dreimal gewaschen und im *M.O.M. mouse Ig blocking reagent* 1h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Zellen und Gewebeschnitte wurden nochmals dreimal gewaschen und im *M.O.M. diluent* (600 µl Proteinkonzentrat verdünnt in 7,5 ml PBS-T + 10% Pferdeserum) für 5 Minuten prä-inkubiert, woraufhin die Inkubation über Nacht im Primär-AK, verdünnt im *M.O.M. diluent*, bei 4°C erfolgte. Die Verdünnung des Primär-AK wurde vorher individuell ausgetestet. Am darauffolgenden Tag erfolgte, nach erneutem dreimaligen Waschen und einem weiteren Blockierungsschrift in Ziegenserum (135 µl in 10 ml PBS-T/HS) für 1h bei RT, die Inkubation mit dem sekundären AK (Cy3 oder Cy5), verdünnt

in 0,01 M PBS + 0,25 M NaCl, für 45 Minuten. Mittels DAPI wurden Zellkerne gegengefärbt (1:30.000 Verdünnung für 5 min) und nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen bzw. Gehirnschnitte in Immu-Mount eingedeckt und dunkel bei 4°C gelagert.

2.11 Funktionelle Analysen

2.11.1 Messung des mitochondrialen Energiestoffwechsels mittels *Seahorse XF^e Technologie*

Der *Seahorse XF^e Flux Analyzer* bietet die Möglichkeit, in intakten, adhärenen Zellen parallel die zwei Hauptenergie-Stoffwechselwege, mitochondriale Atmung und Glykolyse, zu messen. Optische Sensoren (Abbildung 9 A-E) detektieren in Echtzeit den Sauerstoffverbrauch (bezeichnet als *Oxygen Consumption Rate*, OCR) bzw. die extrazelluläre Ansäuerung in Form von Protonen (bezeichnet als *Extracellular Acidification Rate*, ECAR) in einer 200 µm großen Kammer direkt über den Zellen (Abbildung 9 A-F). Die Sensorplatten bieten zudem die Möglichkeit bis zu vier Substanzen (Inhibitoren der Atmungskette, Substrate, Neurotransmitter, etc.) in sogenannte Ports (Abbildung 9 A-A) zu laden, welche dann sequentiell und direkt in das Medium injiziert werden.

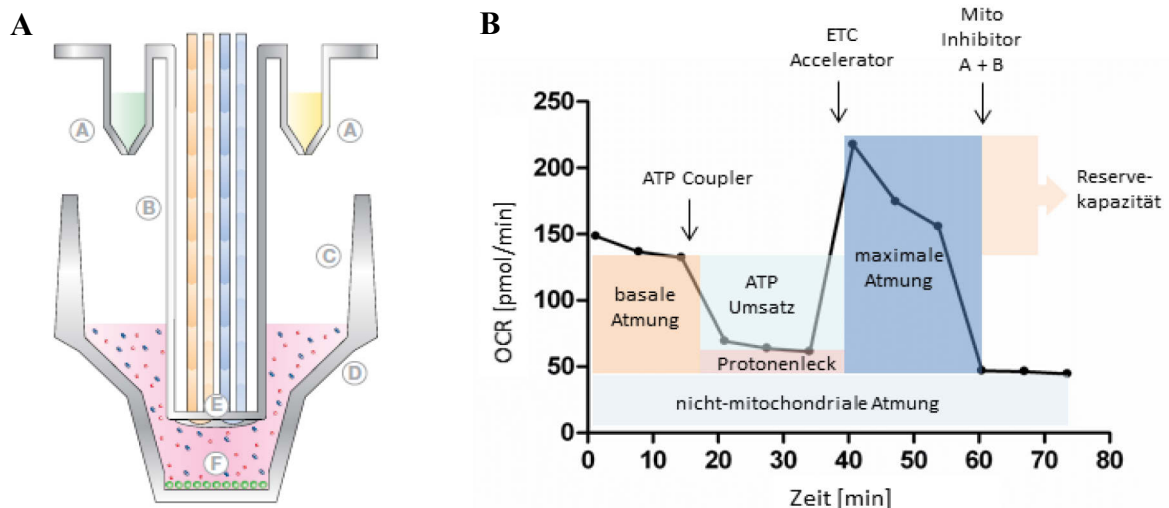


Abbildung 9: Messprinzip im *Seahorse XF^e Flux Analyzer* und mitochondriales Stress Test Profil. A) Schematische Darstellung des Aufbaus einer Seahorse XF^e Sensorplatte, mit Ports (A), optischen Sensoren (E), und der speziellen Seahorse XF^e Zellkulturplatte (D) mit adhärenen Zellen (F). Durch das Auf- und Abbewegen der Sensorplatte wird eine Kammer von 200µm direkt über den Zellen geschaffen, in der der aktuelle Sauerstoffverbrauch sowie die extrazelluläre Ansäuerung in Form von Protonen im Medium gemessen werden. (<http://www.seahorsebio.com/products/how-xf-works.php>) B) Darstellung eines typischen mitochondrialen Stress Test Profils, gemessen in primären WT Astrozyten, nach Injektion spezifischer Inhibitoren. Gekennzeichnet sind die einzelnen Funktionen der mitochondrialen Atmungskette (basale und maximale Atmung, Protonenleck, ATP Umsatz und Reservekapazität). ATP Coupler = Oligomycin, ETC Accelerator = FCCP, Mito Inhibitor A+ B = Rotenone + Antimycin A.

Für die Analyse des Energiestoffwechsels in primären Wildtyp und *Mct8*-defizienten Astrozyten bzw. Neuronen musste zunächst die Zellzahl optimiert werden, sodass beide Zelltypen eine OCR zwischen 50 – 150 pmol/min über eine Messzeit von 18 Minuten (3 min Mixen, 3 min Messen) stabil aufwiesen. Anschließend mussten die Konzentrationen verschiedener spezifischer Inhibitoren bzw. Entkoppler der Atmungskette für beide Zelltypen titriert werden (für die genaue Vorgehensweise siehe *XF⁹⁶ Cell Mito Stress Test Kit Manual* von Seahorse Bioscience). Die Tabelle 13 listet die einzelnen Inhibitoren/Entkoppler und deren Zielkomplexe und Wirkungsmechanismen innerhalb der Atmungskette, welche nach sequentieller Injektion (Komplex CV → CIV → CIII + CI) für die Berechnung wichtiger mitochondrialer Parameter dienen.

Tabelle 13: Zusammenfassung verwendeter Inhibitoren/Entkoppler und deren spezifischer Wirkungsmechanismus innerhalb der mitochondrialen Atmungskette

Inhibitor	Wirkungsmechanismus
Oligomycin/ATP Coupler	Inhibition ATP Synthese durch Blockierung Protonen-Kanal in F0-Teil der ATP Synthase (CV); O ₂ -Verbrauch sinkt
FCCP/ETC Accelerator	Carrier-Ionophor, Entkoppler → $\Delta\psi_m$ → höherer Energie- und O ₂ -Verbrauch unabhängig von ATP-Synthese
Antimycin A	Komplex III-Inhibitor, bindet Cytochrom C Reduktase und inhibiert so die Oxidation von Ubiquinol → Protonengradient gestört; O ₂ -Verbrauch sinkt
Rotenone	Komplex I-Inhibitor, Elektronenfluss vom Fe-S-Zentrum des CI auf CII unterbunden → NADH-Oxidation gestört; O ₂ -Verbrauch sinkt

Die Abbildung 9 B zeigt ein typisches mitochondriales Stress Test Profil gemessen in primären WT Astrozyten nach Injektion der spezifischen Inhibitoren. Die Tabelle 14 fasst die einzelnen Funktionen und deren Berechnung nochmals genauer zusammen. Es wurde immer der Mittelwert über die vollen 3 Minuten Messzeit (= 12 Messpunkte) genutzt. Zudem wurde zu Beginn von jedem Parameter der niedrigste Wert nach Rotenone/Antimycin A Injektion für die nicht-mitochondriale Atmung, verursacht durch detoxifizierende Enzyme, Desaturasen, abgezogen.

Tabelle 14: Übersicht der Berechnung wichtiger Funktionen nach einem mitochondrialen Stresstest in primären murinen Zellen. Zuvor wird noch der niedrigste Wert nach Rotenone/Antimycin A Injektion für die nicht-mitochondriale Atmung von allen Parametern abgezogen.

Parameter	Formel
basale Atmung	3. basaler Messpunkt (vor Injektion)
Protonenleck	niedrigster Messwert nach Oligomycin Injektion
maximale Atmung	höchster Messwert nach FCCP Injektion
ATP Umsatz	basale Atmung - Protonenleck
Reservekapazität	maximale Atmung – basale Atmung
Zell-Respirationskontrollrate (cRCR)	maximale Atmung/Protonenleck
nicht-mitochondriale Atmung	niedrigster Messwert nach Rotenone/Antimycin A Injektion

Ein sog. mitochondrialer Stress Test wurde nach 7 Tagen Kultivierung der Zellen vorgenommen, wovon diese für 5 Tage auf den entsprechenden definierten Medien (siehe 2.8.1 bzw. 2.8.2) mit verschiedenen Schilddrüsenhormonkonzentrationen gehalten wurden. Die Messung erfolgte wie folgt: zunächst wurde das Kultivierungsmedium gegen ein Assaymedium (DMEM 5030, Sigma-Aldrich) mit den entsprechenden Komponenten der definierten Medien sowie 10mM Glukose und 2mM L-Glutamin ausgetauscht (175 µl/well) und die Zellen für 1 Stunde in einem CO₂-freien Inkubator bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Sensorplatte mit den optimierten Inhibitorkonzentrationen (1:8 verdünnt in Assaymedium + definiertes Medium + Schilddrüsenhormone) beladen (25 µl/Port) und zur Kalibrierung in das Seahorse-Gerät gestellt. Nach der Stunde Vorinkubation erfolgte die Messung, wobei immer im Wechsel 3 Minuten das Medium durchmischt und 3 Minuten der Sauerstoffverbrauch bzw. die Ansäuerung in Form von Protonen im Medium gemessen wurde. Nach erfolgter Messung wurde das Medium verworfen und die Zellen bis zur Proteinmessung auf -20°C gelagert.

2.11.2 T3/T4 Radioimmunassay

Für die Quantifizierung der totalen T3- und T4-Konzentrationen in Mausseren wurden radioaktive Immunoassays von DRG Instruments GmbH, Marburg verwendet. Es handelt sich dabei um kompetitive Assays, da die zu untersuchenden Probeseren (20 µl Serum für die Messung des totalen T4- und 25 µl Serum für die Bestimmung des totalen T3-Gehaltes) mit ¹²⁵Iod-gelabeltem T3- bzw. T4-Tracer in Antikörper-beschichteten Röhrchen für 1 Stunde bei RT schüttelnd (280 – 300 rpm) inkubiert wurden. Der flüssige Überstand wurde abgenommen

und die gebundene Radioaktivität in einem Gamma Counter für 1 min/Probe vermessen. Mitgelieferte Standardproben wurden wie Serumproben behandelt und für die spätere Berechnung mitgeführt. Pro Probe bzw. Standard wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Über die Standardkurve konnten die totalen Konzentrationen an T3 und T4 in den zu messenden Seren berechnet werden.

2.11.3 Radioaktive T3-Aufnahme in primären Zellen

Für die Analyse des Transportverhaltens von primären Wildtyp und *Mct8*-defizienten Astrozyten wurden Aufnahmeexperimente mit ^{125}I iodid radioaktiv-markiertem T3 als Substrat durchgeführt. Für einen T3-Uptake wurden 10nM des Tracers eingesetzt. Die Molarität des Tracers berechnete sich hierbei über den Quotienten aus Tracerkonzentration [mCi/ml] durch die spezifische Aktivität [mCi/mmol].

Vor Versuchsdurchführung wurde der Tracer aufgereinigt, um etwaige Kontaminationen durch bereits abgespaltene ^{125}I -markierte Atome zu entfernen. Dafür wurde eine chromatografische Sephadex-Säule hergestellt: 600 μl Sephadex LH-20 wurden über einen Filter (Porengröße: 10 μM , MoBiTec, Göttingen), welcher in einer Sarpette ausgelegt wurde, gegeben und mit 3 ml 0,1 N HCl-Lösung gewaschen. Die zuvor berechnete Menge ^{125}I -T3 wurde auf die Säule gegeben und mit je 3 ml 0,1 N HCl und dH_2O gespült. Die Elution erfolgte in 1 ml $\text{EtOH}:\text{NH}_3$ (49:1). Anschließend wurde dieses in einem Wasserbad (ca. 80°C) und flüssigem Stickstoff-Strom eingedampft und in der entsprechenden Menge Uptake-Puffer (nach Morimoto et al. 2008) aufgenommen.

Die Analysen erfolgten über mehrere Zeitpunkte (1-30 min, Triplikate) bei gleichbleibender Substratkonzentration. Primäre Wildtyp und *Mct8*-defiziente Astrozyten wurden wie in 2.8.1 beschrieben ausgesetzt und kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und es erfolgte die Zugabe von 400 μl pro well des gelösten Substrats und eine Inkubation bei 37°C. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen sofort auf Eis gelagert, das Substratgemisch entfernt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml 40mM NaOH und einer 5-minütigen Inkubation auf einem Schüttler wurden die Zellen lysiert und anschließend in einem Gamma-Counter die Aktivität des von den Zellen aufgenommenen Substrates vermessen.

2.11.4 Dejodase-Aktivitätsmessung

Der radioaktive Dejodase-Assay dient der Bestimmung der enzymatischen Aktivität von 5'-Dejodasen. Es existieren zwei Typen, die Dejodase I (Dio1) und Dejodase II (Dio2), wobei

beide unterschiedliche gewebespezifische Expressionsmuster aufweisen. Mit Hilfe des Assays wird die Abspaltung eines ^{125}I -markierten 5'-Atoms des Phenolrings von 3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin (reverses T3, rT3) gemessen. Durch den Einsatz eines Dio1-spezifischen Inhibitors, 6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU), kann in einem parallelen Ansatz die Aktivität beider 5' Dejodasen-Isoenzyme bestimmt werden.

Proteinhomogenate des zu untersuchenden Gewebes wurden wie in 2.9.1 beschrieben aufgearbeitet. Für die Messung der Dio1-Aktivität in Leberhomogenaten wurden 4 µg Protein in 40 µl Homogenisationspuffer (siehe Tabelle 10) + 1mM DTT pro Reaktionsansatz verdünnt. Es wurden jeweils Triplicate in An- (Dio2-Aktivitätsmessung) und Abwesenheit (Gesamt-Dejodase-Aktivität) von PTU pro Probe gemessen.

Vor Versuchsdurchführung wurde die benötigte ^{125}I -rT3-Menge (0,35 – 0,45 µl pro Reaktionsansatz, abhängig vom Alter des Tracers) aufgereinigt, um etwaige Kontaminationen durch bereits abgespaltene ^{125}I -Atome zu entfernen (siehe 2.11.3). Nach Elution und Eindampfen wurde der aufgereinigte Tracer in der entsprechenden Menge Substratmix (siehe Tabelle 15) gelöst. Die Aktivität des Tracer-Substratmix-Gemisches sollte bei ca. 30.000 counts per minute (cpm) für Dejodase-Aktivitätsmessungen in der Leber liegen.

Tabelle 15: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen für einen radioaktiven Dejodase-Aktivitätsassay

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
10% BSA-Stopplösung	10 g BSA in 10 ml 100 mM PTU-Stammlösung lösen, Auffüllen auf 100 ml mit dH ₂ O
Dowex AG 50WX2-Säulen	300 ml Dowex AG 50W-X2 mit 10%iger Essigsäure auf 500 ml auffüllen, rühren lassen. Filter (MoBiTec; M2210) in Sarpetten legen und luftblasenfrei nach und nach mit einer Pipette befüllen, dabei muss Platz für ein Volumen von 2 ml bleiben
KPO ₄ -Puffer	1 M K ₂ HPO ₄ , 10 mM EDTA, pH 9,4 mit NaOH (Puffer A) 1 M KH ₂ PO ₄ , 10 mM EDTA, pH 4,4 mit HCl (Puffer B) Puffer A vorlegen, durch Zugabe des Puffers B bis zum Erreichen von pH 6,8 titrieren

Tabelle 15: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen für einen radioaktiven Dejodase-Aktivitätsassay

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
100mM PTU-Stammlösung	1,7 g PTU in 80 ml 40 mM NaOH lösen, tropfenweise 0,1 M NaOH zugeben bis $\text{pH} \leq 9$; weitere PTU-Lösungen mit 40 mM NaOH verdünnen
rT3-Stammlösung	10 mM rT3 in 40 mM NaOH lösen, weitere Verdünnungen mit 40 mM NaOH
Sephadex LH20-Säulen	20 % Sephadex LH-20 (w/v) in 100 ml 0,1N HCl
Substratmix (für 1 Reaktionsansatz)	10 μl KPO ₄ -Puffer + 1 mM DTT + 0,41 μl 40 mM NaOH + 0,1 μl 1 mM rT3 auf 50 μl mit dH ₂ O auffüllen
10% Trichloressigsäure	100 ml Eisessig (100%) in 1000 ml dH ₂ O

Für die Messung der Dejodase-Aktivität wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen dreimal 10 μl Wasser bzw. 10 μl PTU-Lösung (10 mM) vorgelegt und 40 μl des zu untersuchenden Leber-Proteinhomogenats auf Eis zugegeben. Hinter einer Abschirmung erfolgte die Zugabe von 50 μl des Tracer-Substratmix-Gemisches pro Ansatz und die Inkubation bei 37°C im Wasserbad für 1h. Zudem wurden drei Negativkontrollen (10 μl Wasser + Tracer-Gemisch) mitgeführt, um Hintergrundaktivitäten zu ermitteln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mit 50 μl BSA-Stopplösung (siehe Tabelle 15) versetzt und auf Eis gelagert. Zu den Negativkontrollen wurde nach Stoppen der Reaktion 40 μl Proteinhomogenat gegeben. Die Fällung der Proteine erfolgte durch die Zugabe von 400 μl eiskalter 10% Trichloressigsäure. Nach Zentrifugation (5 Minuten bei 14.000 x g) wurden 480 μl des Überstandes auf Dowex AG 50WX2-Säulen (vor Verwendung zweimal mit 4 ml 10% Essigsäure gespült) gegeben und freigesetztes ¹²⁵Jodid mit 2 ml 10% Essigsäure eluiert und im Gamma-Counter vermessen.

Für die Berechnung der spezifischen 5' Dejodase-Aktivitäten diente folgende Formel:

$$\text{spez. Dejodase – Aktivität [pmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}] = \frac{2 \times n(\text{rT3}) \times [\text{cpm}(\text{Probe}) - \text{cpm}(\text{Hintergrund})] \times 1000}{\text{cpm}(100\%) \times m \times t \times \frac{480}{550}}$$

Wobei gilt:

Faktor 2... durch 5'-Markierung des ¹²⁵I-rT3 und freie Drehbarkeit des phenolischen Rings um die Diphenyletherbindung kommt es statistisch gesehen zur Abspaltung eines radioaktiven oder eines nicht radioaktiven Iodids

n (rT3)...Stoffmenge nicht-radioaktives rT3 im Reaktionsansatz in nmol

cpm (Probe)...Mittelwert vom Triplikat der gemessenen Probe

cpm (Hintergrund)... Mittelwert der Negativkontrollen

cpm (100%)... Mittelwert des Tracers

m... eingesetzte Proteinmenge in mg

t... Reaktionszeit in min

Quotient 480/550... Verhältnis Überstandsvolumen zu Gesamtvolumen

Die Gesamtaktivität beider 5'-Dejodasen errechnete sich aus den mit Wasser versetzten Triplikaten, wobei die spezifische Aktivität der Typ II-Dejodase mittels der PTU-behandelten Proben errechnet wurde. Über die Differenz beider Aktivitäten ergab sich die spezifische Typ I-Dejodase-Aktivität.

2.11.5 Citratsynthase-Assay

Dieser Enzymaktivitäts-Assay dient der Ermittlung der mitochondrialen Masse, da diese mit der Citratsynthase-Aktivität korreliert. Es wird der Umsatz von Oxalacetat zu Citrat, unter Verwendung von DTNB als Nachweisreagenz und Oxalacetat als Reaktionsinitiator, gemessen. Zellen wurden wie unter 2.8.1 bzw. 2.8.2 beschrieben kultiviert. Nach 7 Tagen wurden diese in 100 µl Homogenisationspuffer (siehe Tabelle 10) aufgenommen, mittels Sonifizieren aufgeschlossen, bei 13.000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und direkt vermessen oder bei -20°C gelagert. Am Tag des Assays wurden alle benötigten Lösungen frisch angesetzt (Tabelle 16). In eine 96 well Platte wurden für die Ermittlung des Hintergrundsignals 300µl Reaktionspuffer vorgelegt, in die Kontrollwells, in welchen die Reaktion nicht mit Oxalacetat initiiert wird, 10 µl der zu untersuchenden Probe + 25 µl Acetyl-CoA (3,6 mM) + 265 µl Reaktionspuffer und in die Probenwells 10 µl der zu untersuchenden Probe + 25 µl Acetyl-CoA (3,6 mM) + 215 µl Reaktionspuffer. Anschließend wurde die Platte für 5 min bei 30°C in einem Plattenreader inkubiert und die Reaktion durch schnelle Zugabe von 50 µl Oxalacetat (3 mM) in die Probenwells gestartet. Die Reaktionskinetik wurde durch den Umsatz von DTNB zu TNB über 5 min bei 412 nm, 30°C und Schütteln alle 30 sec gemessen. Die Citratsynthase-Aktivität wurde wie folgt berechnet:

$$CS - \text{Aktivität} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mg}} \right] = \frac{\Delta OD / \text{min} * \text{Gesamtvolumen}}{\epsilon(DTNB) * \text{Probenvolumen} * d * m(\text{Protein})}$$

Wobei gilt:

$\Delta OD / \text{min} \dots OD / \text{min} (\text{Probe}) - OD / \text{min} (\text{Kontrolle})$

$\epsilon(DTNB) \dots$ molarer Extinktionskoeffizient DTNB (= $13,6 \mu\text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$)

$d \dots$ Weglänge des Lichtstrahls durch Probe (in 96 well Platte = $0,616 \text{ cm}$)

$m(\text{Protein}) \dots$ Proteinmasse im Ansatz in mg

Nach Messung der Citratsynthase-Aktivität erfolgte eine Proteinbestimmung mittels BCA (siehe 2.9.2) für alle Proben, welche für die Normalisierung der Ergebnisse verwendet wurden.

Tabelle 16: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen für einen Citratsynthase-Assay

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Homogenisationspuffer	50mM Tris, 1mM EDTA, 0,1% Triton-X-100, pH 7,4
Citratsynthase Assay Puffer (CSAP)	100mM Tris, 1mM EDTA, 1mM MgCl ₂ , pH 8,2
Reaktionspuffer	0,1mM DTNB in CSAP am Messtag frisch ansetzen
1mM DTNB	in CSAP am Messtag frisch ansetzen
3,6mM Acetyl-CoA	in CSAP (Aliquots -80°C möglich)
3mM Oxalacetat	in CSAP am Messtag frisch ansetzen

2.11.6 Laktatdehydrogenase-Aktivitätsmessung

Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat unter Oxidation von NADH zu NAD⁺ in fast allen Zellen des Organismus.

Cortex- und Striatumgewebe wurde zunächst mit Hilfe eines Dismembrator pulverisiert und auf eine Konzentration von 50 mg/ml in 1x LDH-Puffer eingestellt, homogenisiert, zentrifugiert (10.000 x g, 4°C, 15 min) und der Überstand zur Messung auf Eis gelagert. Am Tag der Messung wurden alle benötigten Lösungen frisch angesetzt (Tabelle 17). In eine 96 well Mikrotiterplatte wurden 25µl Probe vorgelegt und 200µl β-NADH (0,35 mM) dazugegeben. Um die Reaktion zu initiieren wurden zügig 25µl Pyruvat (100 mM) pro well zugegeben und die Messung in einem Plattenreader gestartet. Zur Ermittlung des Hintergrundsignals wurden 200µl β-NADH und 75µl 1x LDH-Puffer vorgelegt. Die Reaktionskinetik wurde durch den Umsatz von NADH zu NAD⁺ über 5 min bei 340nm, 25°C und Schütteln aller 30 sec gemessen. Die LDH-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$LDH - Aktivität \left[\frac{\mu mol}{min * mg} \right] = \frac{\Delta OD/min * Gesamtvolumen * 10^6}{\varepsilon(NADH) * d * m(Protein)}$$

Wobei gilt:

$\varepsilon(NADH)$... molarer Extinktionskoeffizient NADH = 6220 l* mol^{-1} *cm $^{-1}$

d... Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe (96 well Platte = 0,616 cm)

m(Protein)... Proteinmasse im Ansatz in mg

Die Proteinbestimmung aller Proben erfolgte nach Messung der LDH-Aktivität mittels Bradford (siehe 2.9.2).

Tabelle 17: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen für einen Laktatdehydrogenase-Aktivitätsassay

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
10x LDH-Puffer	45,3g KH ₂ PO ₄ , 116,1g K ₂ HPO ₄ in 1 L dH ₂ O lösen, pH 7,5
1x LDH-Puffer	1:10 Verdünnung in dH ₂ O
0,35 mM β -NADH	in 1x LDH-Puffer am Messtag frisch ansetzen
100 mM Pyruvat	in 1x LDH-Puffer am Messtag frisch ansetzen

2.11.7 Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Die Methode der Flüssig-Flüssigextraktion mit anschließender Massenspektrometrie wurde genutzt, um Schilddrüsenhormone, deren Metabolite und Thyronamine in verschiedenen Ausgangsmaterialien zu messen. In dieser Arbeit wurde speziell der Gehalt von SDH in Zellkulturüberständen nach 7-tägiger Kultivierung bzw. von frisch angesetzten definierten Medien für primäre Astrozyten und Neuronen vermessen. Primäre Astrozyten- und Neuronkulturen wurden wie in 2.8.1 und 2.8.2 aufgearbeitet und in Triplikaten pro Behandlung in 12 well Kulturplatten ausgesetzt. Nach 7-tägiger Kultivierung wurden 400 μ l des Mediums in 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt, die Zellen zweimal mit 1xPBS auf Eis gewaschen und alles bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Die Probenextraktion, Messung und Auswertung von bis zu 15 SDH-Metaboliten/Thyronaminen lief folgendermaßen ab: SDH wurden angesäuert und mittels TBME/Isopropanol aus dem Zellkulturmediumüberstand extrahiert. Die isobaren Komponenten wurden mittels LC getrennt und in der MS/MS quantifiziert. Durch mitgeführte ^{13}C - oder 2H -markierte interne Standardproben (z.B. $^{13}C6$ -T4, 2H4 -3-T₁AM)

konnten Qualitätsmerkmale, wie Matrixeffekte und Extraktionseffizienz, analysiert und korrigiert werden (Rathmann et al. 2015).

2.11.8 Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, NMR)

Protonen- (^1H) und Carbon-NMR (^{13}C NMR)-Experimente wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Juan Bernal, Prof. Dr. Sebastian Cerdan (Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC, UAM, CIBERER; Madrid, Spanien) und der vor Ort vorhandenen Service-Einrichtung für Magnetresonanzspektroskopie durchgeführt. Diese Methode wurde genutzt, um den zerebralen Energiestoffwechsel im Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mausmodell zu untersuchen. Sieben Wildtyp- und sechs *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäuse wurden im Alter von sechs Monaten nach Madrid verschifft und dort allen Messungen (^1H und ^{13}C NMR) unterzogen. Mit Hilfe der ^1H NMR kann man *in vivo* spezielle Bereiche, die über einen Voxel (3mm x 3mm x 3mm) im T1-gewichteten MRT-Bild definiert werden, oder *ex vivo* an Gewebebiopsien die endogene Metaboliten-Zusammensetzung genauer untersuchen. Wichtige klinische Parameter sind Cholin, Kreatin und N-Acetylaspartat, die in jedem Spektrum detektierbar sind. Mit Hilfe der LC Model Software wurde die Konzentration einzelner Metabolite durch Messung des Bereiches unterhalb des Peaks ermittelt. Es wurden nur Metabolite mit einer Standardabweichung $\leq 25\%$ in die Auswertung einbezogen. Vor *in vivo* ^1H NMR-Experimenten wurden die Mäuse anästhesiert (Isofluran/ O_2 -Gemisch), in einer Halterung positioniert und in die Mitte des Spektrometers (Zentrum des magnetischen Feldes) geschoben. Während der Messung wurde die Maus weiterhin anästhesiert sowie die Körpertemperatur konstant auf 37°C gehalten und die Atmung überwacht. MRT-Bildaufnahmen und ^1H NMR Messungen erfolgten an einem Bruker Pharmascan 7 Tesla Magnetresonanztomographen.

Im Anschluss wurden die gleichen Tiere ^{13}C NMR Messungen unterzogen. Hierfür wurden die Mäuse zunächst wieder mit einem Isofluran/ O_2 -Gemisch narkotisiert und über die Halsvene (direkter Zugang zum Gehirn) [$1\text{-}^{13}\text{C}$] markierte Glukose konstant über einen Zeitraum von 30 Minuten injiziert ($8\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$). Über diese Zeit wurden die Atmung und die Körpertemperatur der Tiere kontrolliert. Im Anschluss wurde der Gehirnstoffwechsel *in situ* mittels eines 5kW Mikrowellen System (Muromachi Kikai Co. Ltd., Tokyo, Japan) abrupt gestoppt, Cortex und Striatum präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Analyse des Einbaus von ^{13}C -markierten Atomen nach [$1\text{-}^{13}\text{C}$] Glukoseinfusion in wichtige Metabolite des Gehirnstoffwechsels, wie zum Beispiel Laktat, Glutamat oder Glutamin, erfolgte *ex vivo* mittels ^{13}C High Resolution-Magic Angle Spinning (HR-MAS) NMR-Spektroskopie für Cortex und

Striatum (4 KHz Spinning, 4° C, 11.7 Tesla Bruker AVANCE500 WB Spectrometer). Parallel wurden nochmals *ex vivo* ^1H HR-MAS NMR Messungen zur Ermittlung der endogenen Metabolitenkonzentrationen für Cortex und Striatum durchgeführt. Die HR-MAS NMR ist eine Methode, die speziell für die Analyse von intaktem Gewebe entwickelt wurde, bei der keine vorangehende Perchloressigsäure-Extraktion erforderlich ist. Die Auswertung der einzelnen Spektren erfolgte mit Hilfe des NMR Programms *NUTS*TM (Acorn, Freemont, CA), wobei auch hier wieder die Fläche unterhalb des jeweiligen Peaks berechnet und als absoluter Wert für den jeweiligen Metaboliten angenommen wurde. Grafisch dargestellt wurde die absolute Menge eingebautes ^{13}C in verschiedene Metabolite (Laktat, Glutamin, Glutamat, GABA), normalisiert auf einen unbekannten, jedoch über alle Messungen konstanten Peak bei 14,8 ppm.

2.12 Statistik

Die statistische Auswertung aller Ergebnisse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 5.0. Der jeweilige durchgeführte Test sowie die Signifikanzen sind in den Abbildungsbeschriftungen angegeben. Die Fehlerbalken in den Diagrammen wurden als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Phänotypische Charakterisierung der transgenen Mauslinie *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*

Globale *Mct8*-defiziente Mäuse wurden während der letzten 10 Jahre ausführlich hinsichtlich ihres SDH-Metabolismus und ihres Verhaltens studiert und charakterisiert. Diese Mäuse replizieren zwar den abnormalen SDH-Phänotyp (erhöhte T3-, erniedrigte T4- und normale bis erhöhte TSH-Serumkonzentrationen), allerdings nicht den neurologischen, wie er in AHDS Patienten beobachtet wird. Neben einer normalen T4-Aufnahme, ist die T3-Aufnahme in das Gehirn *Mct8*-defizienter Mäuse stark beeinträchtigt. Gleichzeitig spricht eine erhöhte Dejodase 2-Aktivität für eine hypothyreote Situation im *Mct8*-defizienten Gehirn allgemein (Trajkovic et al. 2007). Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, ob im *Mct8*-defizienten Gehirn eine gestörte Aufnahme von T4 in Astrozyten vorliegt oder ob Neurone ihren hypothyreoten Zustand an Astrozyten signalisieren? Um diese Frage detaillierter zu beantworten, wurde ein Neuron-spezifisches *Mct8*-defizientes Mausmodell generiert. Vorteil gegenüber dem globalen Mausmodell ist, dass metabolische Veränderungen, die durch den Verlust von *Mct8* speziell in Neuronen auftreten, nebst einer funktionalen, d.h. *Mct8*-exprimierenden Blut-Hirn-Schranke (BHS) untersucht werden können.

Für die folgenden Ergebnisse ist es wichtig die Kennzeichnung der entsprechenden Genotypen an dieser Stelle zu erläutern: Das Gen *Mct8* wird X-chromosomal vererbt und somit sind männliche konditionale („gefloxt“) Nachkommen als *Mct8^{fl/y}* und weibliche Nachkommen als *Mct8^{fl/fl}* benannt. Zudem wurde für die meisten Versuche das konstitutive (folgend auch als „global“ bezeichnet) *Mct8*-defiziente Mausmodell für Vergleichsstudien herangezogen. Männliche Wildtyp (WT) Mäuse werden im Folgenden als *Mct8^{+/y}*, knockout (KO) Mäuse als *Mct8^{-y}*, heterozygote weibliche Kontrolltiere als *Mct8^{+/-}* und weibliche KO Mäuse als *Mct8^{-/-}* gekennzeichnet.

Zum Nachweis des spezifischen Expressionsverlustes von *Mct8* in neuronalen Zellen wurde ein Multi-Organ Western Blot (Leber, Schilddrüse, Hypophyse von männlichen drei Monate alten Mäusen) mit einem Antikörper gegen *Mct8* durchgeführt (Abbildung 10 A). Als Kontrolle wurden die gleichen zu untersuchenden Organe der globalen *Mct8*-defizienten Maus (*Mct8^{-y}*) mitgeführt. Evident wird, dass *Mct8* in allen untersuchten Organen der *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Maus detektiert wird (ca. 60 kDa). In der globalen *Mct8* KO-Maus kann jedoch in den entsprechenden Organen kein *Mct8* mehr detektiert werden. Zudem konnte bei einzelnen Organen, wie Leber und Schilddrüse, die oligomere Form bei ca. 130 kDa detektiert werden.

Eine signifikante Reduktion der *Mct8*-Expression bei Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen konnte in Cortex und Hypothalamus mittels quantitativer PCR nachgewiesen werden (Abbildung 10 B).

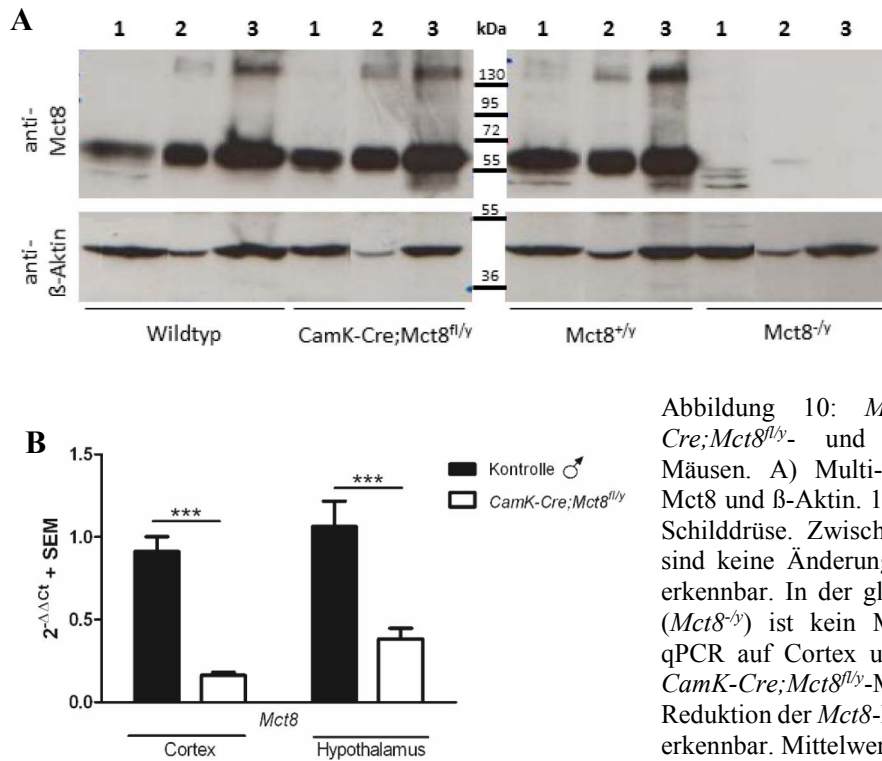


Abbildung 10: *Mct8*-Expression in *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*- und globalen *Mct8*-defizienten Mäusen. A) Multi-Organ Western Blot gegen *Mct8* und β -Aktin. 1 – Hypophyse, 2 – Leber, 3 – Schilddrüse. Zwischen Genotypen und Organen sind keine Änderungen in der Proteinexpression erkennbar. In der globalen *Mct8* knockout Maus (*Mct8^{-/-}*) ist kein *Mct8*-Signal detektierbar. B) qPCR auf Cortex und Hypothalamus RNA von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen. Es ist eine deutliche Reduktion der *Mct8*-Expression in beiden Organen erkennbar. Mittelwert + SEM, n=8. ***, $p \leq 0,001$ (Mann-Whitney-U Test).

3.1.1 Charakterisierung äußerer Merkmale

In dieser Arbeit wurden für alle Untersuchungen Mäuse im Alter von drei und sechs Monaten analysiert. Die Tiere zeigten keine äußerlichen Veränderungen hinsichtlich Körpergewicht und Körpergröße sowie im Herzgewicht (normalisiert auf das Körpergewicht) (Abbildung 11). Im allgemeinen Verhalten, wie Paarung, Wurfgröße oder Futteraufnahme, konnten ebenfalls keine Auffälligkeiten im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern beobachtet werden.

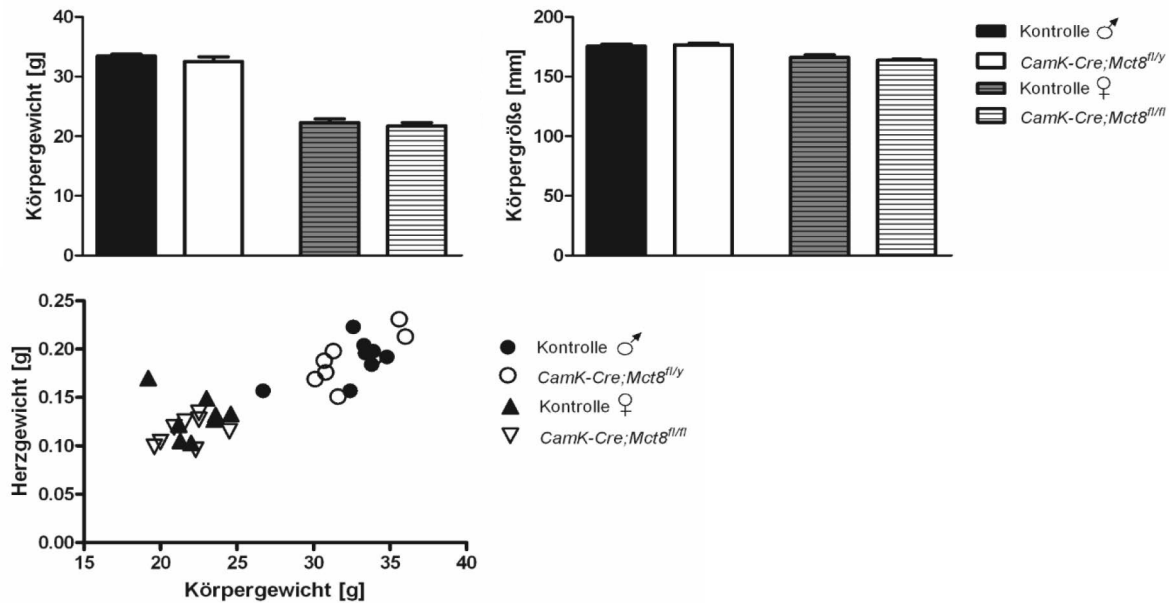


Abbildung 11: Phänotypische Charakterisierung von adulten *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*- und *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern. Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente Mäuse zeigen keine Veränderungen im Körpergewicht und der Körpergröße sowie im Herzgewicht (normalisiert auf das Körpergewicht). Mittelwert + SEM, n=8.

3.1.2 Charakterisierung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse (HPT-Achse)

Ein weiteres prominentes Merkmal von Patienten mit Mutationen im SDH-Transporter *MCT8* sind signifikant veränderte SDH-Konzentrationen im Serum, welche auch im konstitutiven *Mct8*-defizienten Mausmodell repliziert werden konnten. Die Messung von totalen SDH-Serumkonzentrationen in drei Monate alten männlichen *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen zeigten signifikant erhöhte T3- und normale T4-Serumkonzentrationen, wobei weibliche Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente Mäuse leicht erhöhte T4- und normale T3-Konzentrationen aufweisen (Abbildung 12 A). Die Analysen der T3- und T4-Serumparameter von sechs Monate alten männlichen und weiblichen *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen zeigten ähnliche Tendenzen, jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr auf (Daten nicht gezeigt). Da die Ausschüttung von SDH einem komplexen Regelkreis unterliegt, wurde zur vollständigeren Analyse der HPT-Achse die Genexpression des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (*Tsh*) sowie der Dejodase 2 (*Dio2*) in der Hypophyse untersucht. Änderungen im Tsh-Spiegel konnten nur auf transkriptioneller Ebene der Tsh β -Untereinheit (spezifische Untereinheit des Tsh) untersucht werden. Wie die Abbildung 12 B zeigt, wurden keine Änderungen in der Genexpression von *Tshb* und *Dio2* zwischen Kontroll- und Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Tieren detektiert. Des Weiteren zeigten immunhistochemische Untersuchungen der Schilddrüsen männlicher und weiblicher *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäuse keine morphologischen Veränderungen

(Daten nicht gezeigt). Demzufolge sind die geringfügig erhöhten T4- und T3-Konzentrationen im Serum nicht auf eine übermäßige Stimulation der Schilddrüse zurückzuführen.

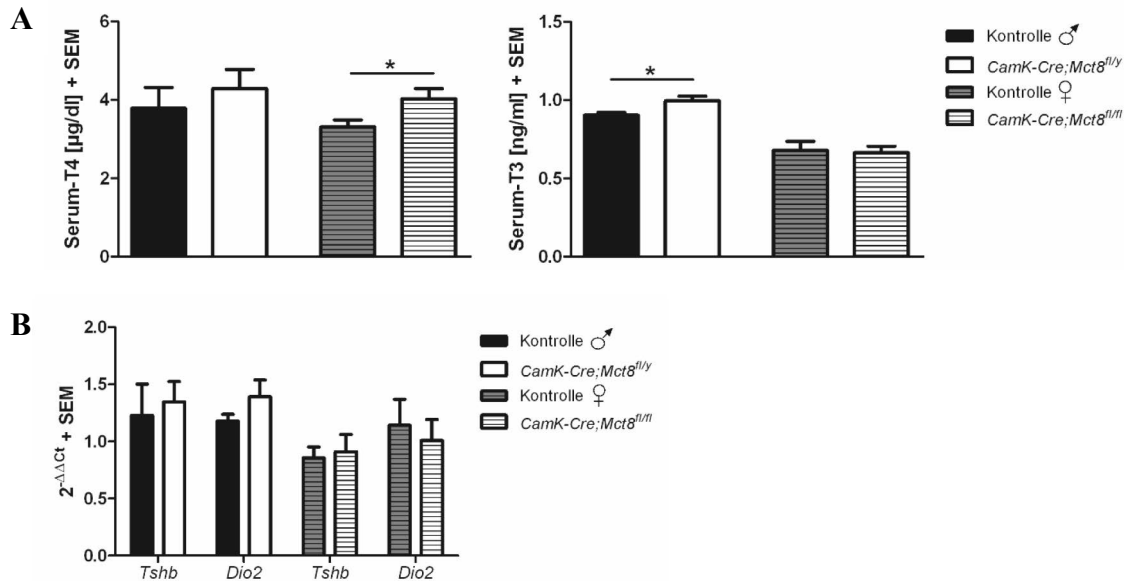


Abbildung 12: Charakterisierung der HPT-Achse in *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*- und *CamK-Cre;Mct8^{fl/m}*-Mäusen im Alter von drei Monaten. A) Totale T4- und T3-Konzentrationen im Serum von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*- und *CamK-Cre;Mct8^{fl/m}*-Mäusen im Vergleich zu WT Geschwistern. Männliche Mäuse weisen signifikant erhöhte T3-Serumkonzentrationen auf, wobei weibliche Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente Mäuse erhöhte T4-Konzentrationen im Serum aufweisen. B) *Tshb* und *Dio2*-Genexpression in *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*- und *CamK-Cre;Mct8^{fl/m}*-Mäusen. Es konnten keine Änderungen der hypophysären *Tshb*- und *Dio2*-Genexpression zwischen den Genotypen und Geschlechtern detektiert werden. Mittelwert + SEM, n=8. *, p ≤ 0,05 (Mann-Whitney-U Test).

3.1.3 Charakterisierung peripherer Organe

AHDS Patienten leiden an einer stark ausgeprägten Muskelhypotonie verbunden mit Einschränkungen des Bewegungsapparates. Mit Hilfe des Rotarod-Tests wird die motorische Koordination und Ausdauer von Mäusen untersucht. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den Tieren über fünf aufeinanderfolgende Läufe gemessen werden, wobei die Weibchen insgesamt eine längere Ausdauer über die Läufe zeigten (Abbildung 13).

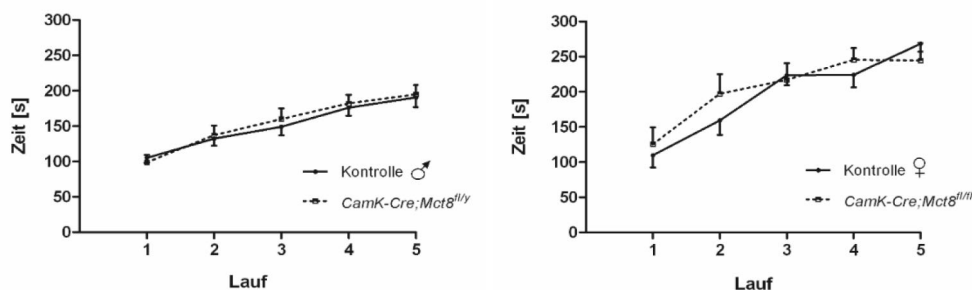


Abbildung 13: Rotarod-Test mit *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*- und *CamK-Cre;Mct8^{fl/m}*-Mäusen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern. Über fünf aufeinanderfolgende Läufe konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Verweildauer festgestellt werden. Mittelwert ± SEM, n=8.

Globale *Mct8*-defiziente Mäuse weisen neben den veränderten SDH-Serumkonzentrationen auch Organ-spezifische Veränderungen auf. So ist in diesen Tieren zum Beispiel die Leber ein hyperthyreotes Organ, unter anderem gekennzeichnet durch eine erhöhte Dejodase 1 (Dio1)-Aktivität. Auch diese wurde in den Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Tieren beider Geschlechter untersucht. Aufgrund der nur schwach ausgeprägten veränderten SDH-Serumkonzentrationen wurden keine signifikanten Änderungen der Leber Dio1-Aktivität erwartet. Ein radioaktiver Assay zur Messung der Dejodase-Aktivität bestätigte dies (Abbildung 14).

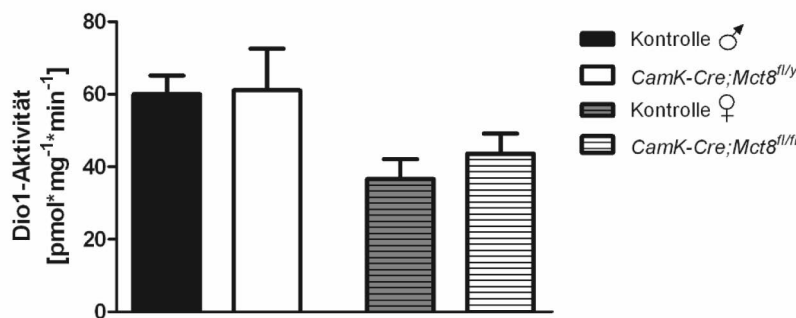


Abbildung 14: Messung der Leber Dejodase 1-Aktivität in *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*- und *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen. Es konnten keine Änderungen in der Dio1-Aktivität zwischen den Genotypen detektiert werden. Deutlich wird eine insgesamt geringere Dio1-Aktivität in weiblichen Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen. Mittelwert + SEM, n=8.

3.2 Gehirn-Phänotyp von *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen

Die bisher gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente Mäuse keine drastischen Änderungen hinsichtlich ihres SDH-Stoffwechsels und der HPT-Achse aufweisen. Demzufolge kann dieses Mausmodell genutzt werden, um spezifisch den Einfluss des neuronalen Verlustes von *Mct8* mit einer funktionalen, *Mct8*-exprimierenden Blut-Hirn-Schranke, zu untersuchen.

3.2.1 Analyse neuronaler Marker

Es ist bekannt, dass SDH eine wichtige Stellung in der korrekten Gehirnentwicklung bereits im Fetus einnehmen. Um zu untersuchen, ob der Verlust von *Mct8* zu strukturellen Veränderungen im Gehirn führt, wurden immunhistochemische Färbungen auf koronalen Gehirnschnitten gleicher Ebenen von WT und *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}* durchgeführt. Abbildung 15 zeigt die Färbung gegen *Mct8* im somatosensorischen *barrel field* des Cortex auf beiden untersuchten Schnitten. Eine deutliche zelluläre, membranständige Färbung gegen *Mct8* ist im Wildtyp im Vergleich zur Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Maus zu erkennen. Bei Betrachtung der neuronalen

Färbungen gegen NeuN (Abbildung 15) zeigt sich, dass diese Bereiche stark mit Neuronen ausgekleidet sind und somit kann geschlussfolgert werden, dass die im *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Schnitt fehlende Mct8-Färbung neuronalen Zellen entspricht. Des Weiteren hat der neuronale Verlust von *Mct8* keinen Einfluss auf die Gesamtheit der Neuronen im Cortex und Striatum, wie die Färbung gegen NeuN zeigt (Abbildung 15). Die Analyse der Interneuron-Marker Parvalbumin und Calretinin (Abbildung 15) zeigt keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Zusätzlich wurde die Expression von Calbindin, Gad65 und Gad67 untersucht (Daten nicht gezeigt). Es konnten jedoch auch hier keine Änderungen beobachtet werden.

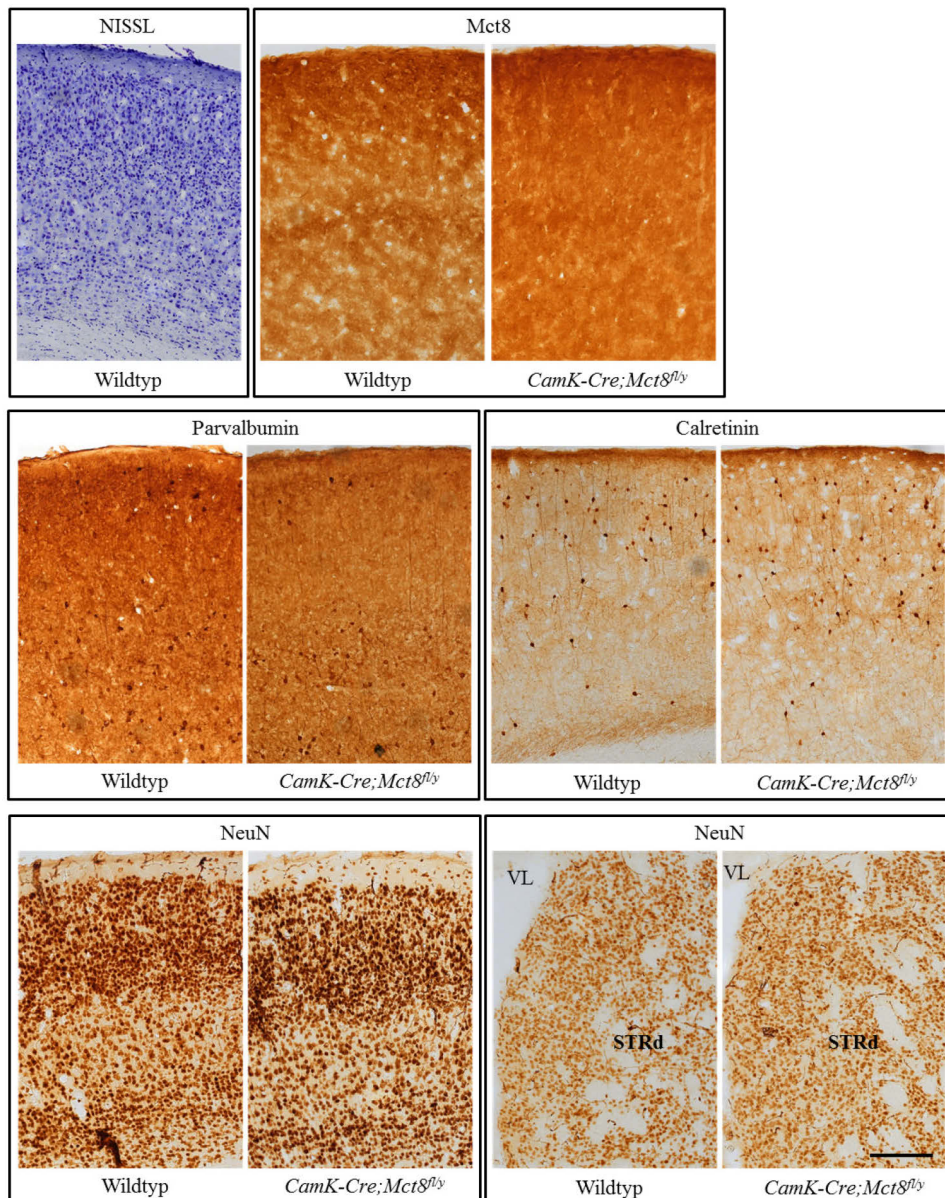


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbungen im somatosensorischen Cortex (*barrel field*) auf Wildtyp- und *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Gehirnschnitten. NISSL als Übersichtsfärbung des *barrel field* des somatosensorischen Cortex. Im WT ist eine eindeutige membranständige Mct8-Lokalisation detektierbar, im neuronalen *Mct8*-defizienten Schnitt ist diese stark verringert. Für die Expression von Parvalbumin und Calretinin sowie NeuN im Cortex und dorsalem Striatum (STRd) sind keine Unterschiede zwischen den Genotypen erkennbar. VL = lateraler Ventrikel. Maßstabsbalken entspricht 200µm.

3.2.2 Analyse von Schilddrüsenhormon-regulierten Genen mittels qPCR

Es ist bekannt, dass SDH zahlreiche, zerebrale Gene über die Bindung an deren TREs positiv oder negativ regulieren. Besonders im globalen *Mct8*-defizienten Mausmodell wurde dies von mehreren Gruppen untersucht (Morte et al. 2010; Liao et al. 2011; Chatonnet et al. 2015). Um die Rolle des neuronalen Verlustes von *Mct8* im Vergleich zum globalen *Mct8* KO zu untersuchen, wurden Genexpressionsanalysen mittels quantitativer PCR auf Cortex-RNA durchgeführt. Der Fokus lag auf SDH-regulierten Genen, welche basierend auf ihrer Expressionsstärke, einem bestimmten zerebralen Zelltyp (Neuron, Astrozyt, Oligodendrozyt) zugeordnet werden konnten (Cahoy et al. 2008b). Insgesamt konnte für keines der untersuchten Gene eine signifikant erhöhte oder verminderte Expression in Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten männlichen und weiblichen Mäusen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern detektiert werden (Abbildung 16). Auch in gleichaltrigen (3 Monate) globalen *Mct8* KO-Mäusen konnten nicht alle, in der Literatur beschriebenen Regulationen reproduziert werden. *Hairless* (*Hr*) ist ein klassisches SDH-reguliertes Gen (Thompson et al. 2000), welches in der Literatur häufig als Marker für veränderte SDH-Konzentrationen verwendet wird. Konstitutive *Mct8*-defiziente Mäuse zeigen stets eine Reduktion der *Hr*-Genexpression (Morte et al. 2010; Ferrara et al. 2013). Eine signifikant erniedrigte Expression konnte jedoch nur in weiblichen Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen detektiert werden. Die *Dejodase 2* (*Dio2*) wird im Cortex globaler *Mct8*-defizienter Mäusen, aufgrund der verringerten T3-Konzentration, induziert. Eine Steigerung der Genexpression konnte im globalen *Mct8* KO-Mausmodell ebenfalls gezeigt werden. Im Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mausmodell findet diese Induktion nicht statt. Es zeigt sich eher eine Reduktion. In diesem Mausmodell liegt bei normalen T4-Serumspiegeln eine funktionale, *Mct8*-exprimierende BHS vor, wodurch die SDH-Aufnahme in das Gehirn unbeeinträchtigt stattfindet und somit auch die Astrozyten, als spezifische *Dio2*-exprimierende Zellen, mit adäquaten SDH-Konzentrationen versorgt werden. Vergleicht man beide Datensätze, so wird eine gegensätzliche Genregulation in Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten zwischen dem globalen und Neuron-spezifischen *Mct8* KO ersichtlich: z.B. ist die *Dio2* und *Slc1a3* im globalen *Mct8* KO erhöht, im Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mausmodell tendenziell erniedrigt. Anhand dieser Daten zeigt sich ein deutlicher Einfluss von *Mct8* auf die kortikale Genexpression in männlichen und weiblichen *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen ohne stark veränderte SDH-Konzentrationen und einer funktionierenden BHS. Astrozyten spielen in diesem Kontext, als Versorger der Neurone mit T3, eine wichtige Rolle, da diese besonders starke Veränderungen in der Expression spezifischer Gene zeigen.

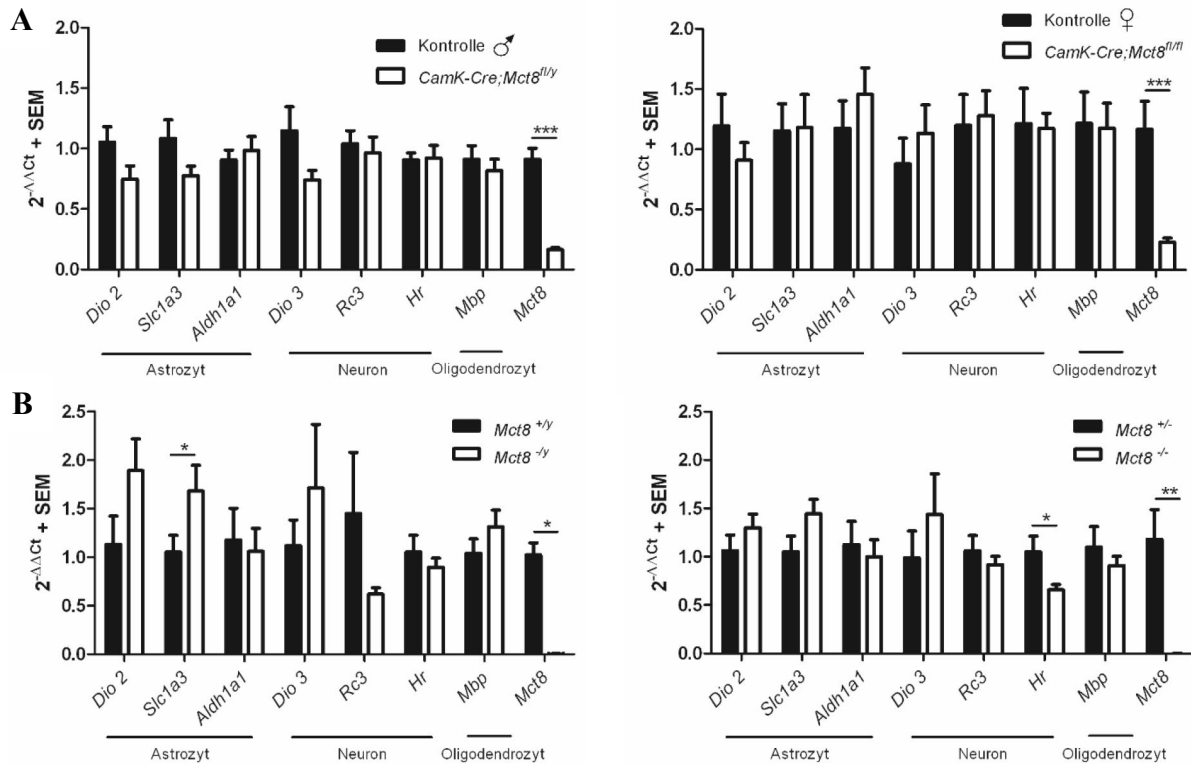


Abbildung 16: Genexpressionsanalysen in *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*- und *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*- sowie globalen *Mct8*-defizienten Mäusen. Es zeigt sich eine gegensätzliche Zelltyp-spezifische Regulation der Gene in Neuron-spezifischen (A) vs. globalen *Mct8*-defizienten (B) Mäusen, wobei besonders Astrozyten-spezifische Gene betroffen sind. Die Kennzeichnungen „Astrozyt“, „Neuron“ und „Oligodendrozyt“ entsprechen der Zelltyp-spezifischen Genexpression. Mittelwert + SEM, n=6-8. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$ (Mann-Whitney-U Test).

3.2.3 Analyse des zerebralen Energiestoffwechsels mittels NMR *in vivo*

Es liegt der Verdacht nahe, dass der eingeschränkte SDH-Transport in Neurone mit den beobachteten neurologischen Defiziten in AHDS Patienten einhergeht. Bereits 2013 konnte die Gruppe um Prof. Juan Bernal mittels $[1-^{13}\text{C}]$ NMR zeigen, dass adulte globale *Mct8*-defiziente Mäuse einen erhöhten oxidativen Metabolismus, charakterisiert durch eine erhöhte Glutamat-Anreicherung, sowie eine erhöhte glutamaterge und GABAerge Neurotransmission aufweisen. Diese Beobachtungen korrelieren jedoch nicht mit einer allgemeinen zerebralen hypo- oder hyperthyreoten Situation (Rodrigues et al. 2013a). Um den neuronalen Verlust von *Mct8* in diesem Kontext genauer zu untersuchen, wurden männliche *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäuse, in Kooperation mit Prof. Juan Bernal und Prof. Sebastian Cerdan (IIB-UAM, Madrid Spanien), NMR Experimenten unterzogen. Es wurden sieben Wildtyp- und sechs *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäuse analysiert. Zunächst wurde mittels ^1H NMR *ex vivo* die relative, endogene Metabolitenkonzentration speziell in Cortex und Striatum dokumentiert (Abbildung 17). Wichtige zerebrale Markerproteine sind vor allem N-Acetyl-L-Aspartat (NAA), Cholin (Cho)

und Kreatin/Phosphokreatin (Cr/PCr), welche im ^1H NMR detektiert werden. Diese Metabolite lassen Schlussfolgerungen über neuronale Zellpopulationen, den Phospholipid Umsatz und den Energiespeicher zu, wodurch zerebrale Dysfunktionen identifiziert werden können. Die Summe aus Kreatin und Phosphokreatin (Cr + PCr) diene der Normalisierung, da diese über das Gehirn als stabil angesehen werden kann (Provencher 1993). Alle untersuchten zerebralen Metabolite zeigen sowohl im Cortex, als auch im Striatum von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen keine Änderungen zwischen beiden Genotypen auf. Einzig die endogene Laktat-Konzentration ist tendenziell in *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen reduziert.

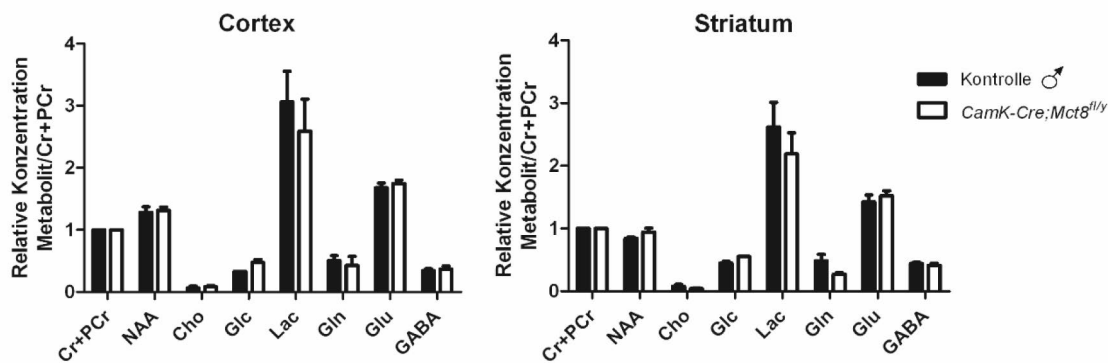


Abbildung 17: ^1H NMR-Analysen in Cortex und Striatum von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen. Sowohl Wildtyp, als auch Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente Mäuse zeigen keine Änderungen in der kortikalen und striatalen endogenen Zusammensetzung detektierter Substrate und Neurotransmitter. Kreatin (Cr), Phosphokreatin (PCr), N-Acetyl-L-Aspartat (NAA), Cholin (Cho), Glukose (Glc), Laktat (Lac), Glutamin (Gln), Glutamat (Glu), γ -Aminobuttersäure (GABA). Mittelwert + SEM, n=6-7.

Anschließend wurden die gleichen Mäuse ^{13}C NMR Experimenten unterzogen. Unter Narkose wurde über die Halsvene $[1-^{13}\text{C}]$ markierte Glukose über 30 Minuten direkt in das Gehirn injiziert, anschließend der Stoffwechsel abrupt gestoppt und fixiert und Cortex und Striatum präpariert. Abbildung 18 zeigt zunächst schematisch den Metabolismus von $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose und den damit verbundenen Einbau in Metabolite der Glykolyse, dem Citratzyklus (TCA Zyklus) und dem Neurotransmitterstoffwechsel (gekennzeichnet durch schwarze und graue Markierungen der entsprechenden Kohlenstoffatome in der Struktur des jeweiligen Metaboliten).

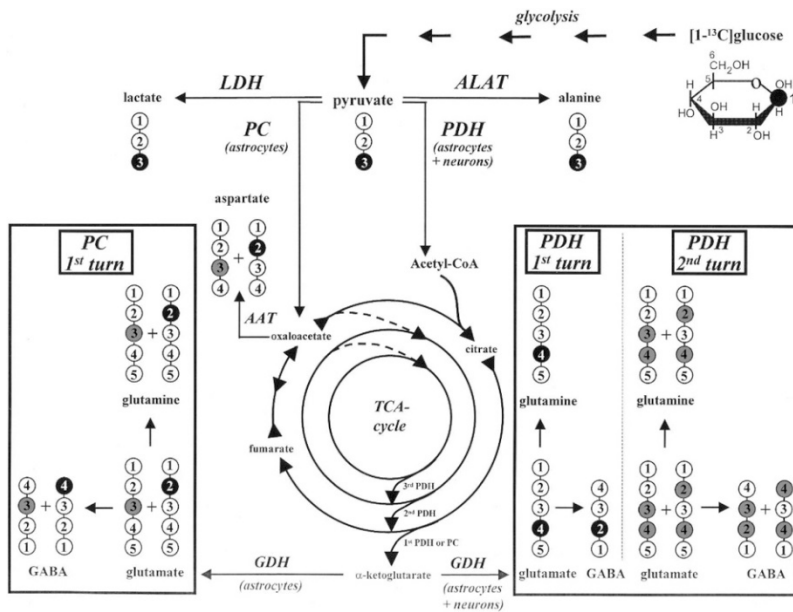


Abbildung 18: Darstellung der Verstoffwechselung von $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose und deren ^{13}C -Einbau in Metabolite der Glykolyse, dem Citratzyklus (TCA Zyklus) und Neurotransmittern im Gehirn. Schwarze Markierungen entsprechen dem ^{13}C -Einbau nach Verstoffwechselung von $[3-^{13}\text{C}]$ Pyruvat via PDH (Glutamat C4, Glutamin C4, GABA C2) und/oder PC (Glutamat C2, Glutamin C2, GABA C4). Graue Markierungen symbolisieren den Einbau von ^{13}C nach einem zweiten Durchlauf des Stoffwechsels in die jeweiligen Metabolite (vorwiegend C2-/C3-Einbau). Bild aus Zwingmann et al. (2003).

Abbildung 19 A zeigt beispielhaft ein ^{13}C NMR Spektrum vom Cortex einer Wildtyp-Maus mit der für die jeweiligen detektierbaren Metaboliten charakteristischen chemischen Verschiebung. Die Signalfäche jedes Metaboliten ist dabei proportional zum ^{13}C -Einbau. Abbildung 19 B zeigt den ^{13}C -Einbau in zerebrale Metabolite gemessen in Wildtyp- und *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen. Ein unbekannter Peak bei 14,8 ppm diente dabei für die Normalisierung, da dieser über alle NMR Messungen konstant war. Im Cortex und Striatum sind keine Änderungen in der Signalintensität des detektierbaren Glutamat C4 (Glu C4) und GABA C2 zwischen beiden Genotypen zu verzeichnen. Glutamin C2 und Glutamat C2 waren in den meisten Spektren nicht eindeutig als einzelne Signale unterscheidbar, weshalb diese zu Glx C2 (Gln C2 + Glu C2) zusammengefasst wurden. Jedoch zeigen sich auch hier keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Glutamin C4 (Gln C4) konnte jeweils nur in einer von sieben Wildtyp- und einer von sechs *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen im Cortex und im Striatum gar nicht detektiert werden. Das Signal für diesen Metaboliten liegt in allen untersuchten Tieren unter dem Detektionslimit und konnte somit nicht ausgewertet werden. Allerdings ist in neuronalen *Mct8*-defizienten Mäusen ein verringerter ^{13}C -Einbau in Laktat C3 detektierbar, welcher im Striatum signifikant vermindert ist. Diese Reduktion deutete sich bereits in den ^1H NMR Daten in Cortex und Striatum an (Abbildung 17). Die Ergebnisse zeigen, dass *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäuse einen

erniedrigten Stoffwechsel in wichtigen zerebralen Regionen, wie Cortex und Striatum, aufweisen, charakterisiert durch einen geringeren Bedarf an Laktat als Energiesubstrat.

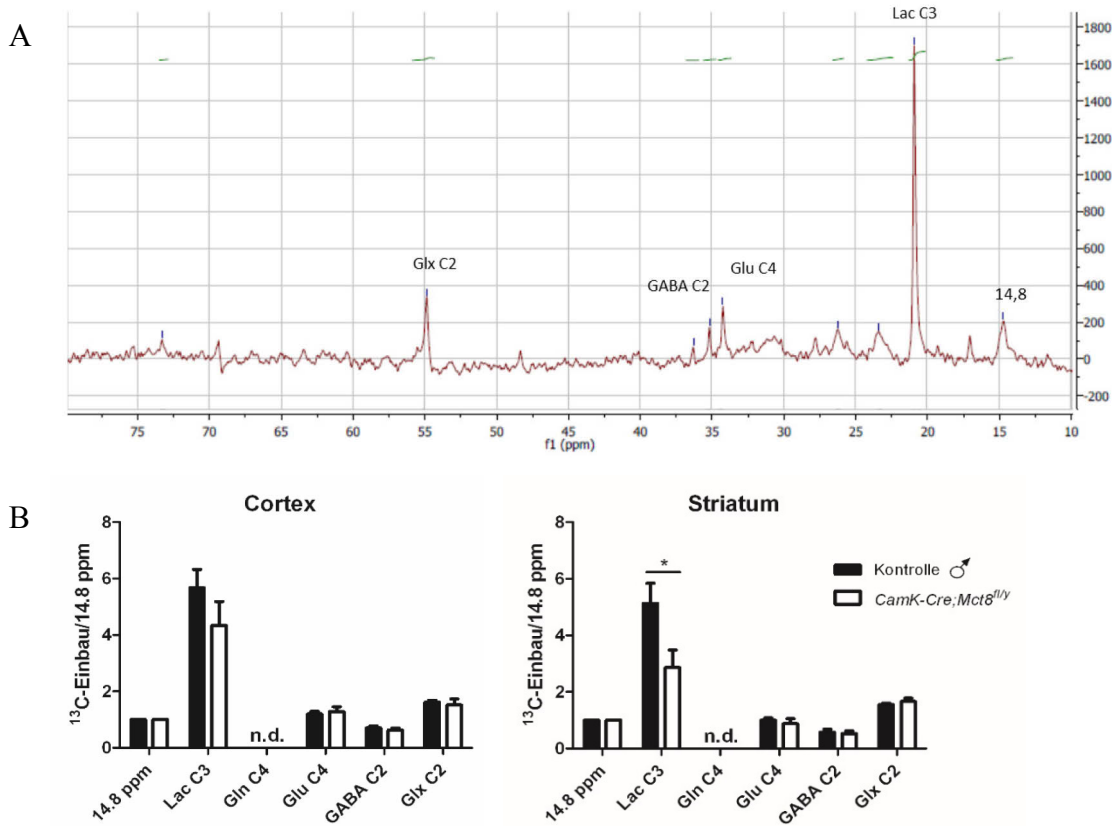


Abbildung 19: ^{13}C NMR Analysen nach Infusion von $[1-^{13}\text{C}]$ markierter Glukose in Cortex und Striatum von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen. A) Beispielhafte Darstellung eines ^{13}C NMR Spektrums vom Cortex einer Wildtyp-Maus. Gekennzeichnet sind die detektierbaren Metabolite Lac C3, Glu C4, GABA C2 und Glx C2, aufgrund ihrer charakteristischen chemischen Verschiebung [ppm]. B) Es sind keine Änderungen im ^{13}C -Einbau in die Metabolite Glutamat C4, GABA C2 und Glx C2 in Cortex und Striatum zwischen beiden Genotypen detektierbar. Glutamin C4 lag in den meisten Tieren unter dem Detektionslimit und konnte deshalb nicht ausgewertet werden. Neuronale *Mct8*-defiziente Mäuse weisen allerdings eine verringerte Intensität des Laktat C3-Signals in Cortex und Striatum im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf, wodurch sich eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels andeutet. Laktat (Lac C3), Glutamin (Gln C4), Glutamat (Glu C4), γ -Aminobuttersäure (GABA C2), Glutamin C2 + Glutamat C2 (Glx C2), n.d. nicht detektierbar, 14,8 ppm ist ein unbekannter, aber über alle Messungen konstanter Peak, der zur Normalisierung herangezogen wurde. Mittelwert + SEM, n=6-7. *, $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney-U Test).

Um zu überprüfen, ob die verringerten detektierten Laktatmengen in Cortex und Striatum auf eine Veränderung der Ldh-Enzymaktivität zurückzuführen sind, wurde diese aus Geweben dieser Gehirnregionen gemessen. Für den Cortex konnten keine signifikanten Veränderungen in der Ldh-Aktivität detektiert werden. Im Striatum von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen zeigt sich dagegen eine deutliche Reduktion des Umsatzes von Pyruvat zu Laktat (Abbildung 20). Somit sind die verringerten Laktatmengen auf eine verringerte Ldh-Aktivität vor allem im Striatum von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen zurückzuführen.

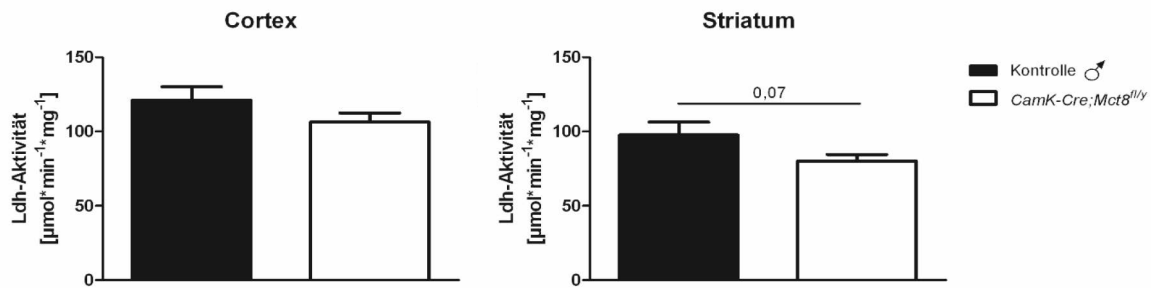


Abbildung 20: Messung der Ldh-Aktivität in Cortex und Striatum von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen. Im Cortex konnten keine Veränderungen im Umsatz von Pyruvat zu Laktat zwischen Wildtyp- und Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen gemessen werden. Im Striatum von Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen zeigt sich dagegen eine deutliche Reduktion der Ldh-Aktivität. Mittelwert + SEM, n=8. Statistik mittels Mann-Whitney-U Test.

Um die Annahme eines erniedrigten zerebralen Metabolismus Neuron-spezifischer *Mct8*-defizienter Mäuse auf molekularbiologischer Ebene genauer zu untersuchen, wurde die Expression relevanter Transportproteine aus der Laktat-, Glukose-, Glutamin-, Glutamat (*EAAT*'s und *Vglut*'s)- und GABA-Transporterfamilie sowie Schlüsselenzyme des Energie (*Pfkm*, *Ldha/b*)- und Neurotransmitter (*Pag*, *Gs*, *Gad1/2*, *Pc*)-Stoffwechsels mittels quantitativer PCR analysiert. Insgesamt sind alle untersuchten Transportergene, bis auf *Glut1* und *Glut3* sowie *Mct1* und *Mct2*, im Cortex von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren tendenziell niedriger exprimiert. Eine signifikante Reduktion der Genexpression zeigte sich für den Astrozyten-exprimierten GABA-Transporter *Slc6a11*, welcher an der Wiederaufnahme von GABA aus dem präsynaptischen Spalt beteiligt ist (Minelli et al. 1996) und vor allem für die Glutamintransporter *Slc38a2*, *Slc38a3* und *Slc38a5* in Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen (Abbildung 21 „Transporter“). *Slc38a2* ist ein in glutamatergen Neuronen exprimierter System A Transporter und für die Aufnahme von Gln in diese verantwortlich (Melone et al. 2006). *Slc38a3* und *Slc38a5* hingegen gehören zu den System N Transportern und sind in Astrozyten exprimiert, wo sie an der Abgabe von Gln in den extrazellulären Raum bzw. an Neurone beteiligt sind (Broer et al. 2001). Bei der Analyse wichtiger Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels im Cortex Neuron-spezifischer *Mct8*-defizienter Mäuse zeigte sich zudem eine signifikant verminderte Genexpression der Phosphofruktokinase (*Pfkm*), der Glutamatdecarboxylase 1 (*Gad1*) und der Glutaminsynthetase (*Gs*) (Abbildung 21 „Enzyme“). Zusammenfassend deuten die verringerten Expressionsdaten wichtiger Enzyme und Transporter für den Neurotransmittermetabolismus oder deren Biosynthese mit der im NMR detektierten verringerten Laktatintensität auf einen verlangsamten kortikalen Metabolismus sowie einer reduzierten synaptischen Aktivität bei

neuronalen *Mct8*-Verlust hin. Trotz des reduzierten Transportes von Gln und GABA zwischen Astrozyten und Neuronen, zeigen *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen *in vivo* keine Änderungen der endogenen Neurotransmitterkonzentrationen.

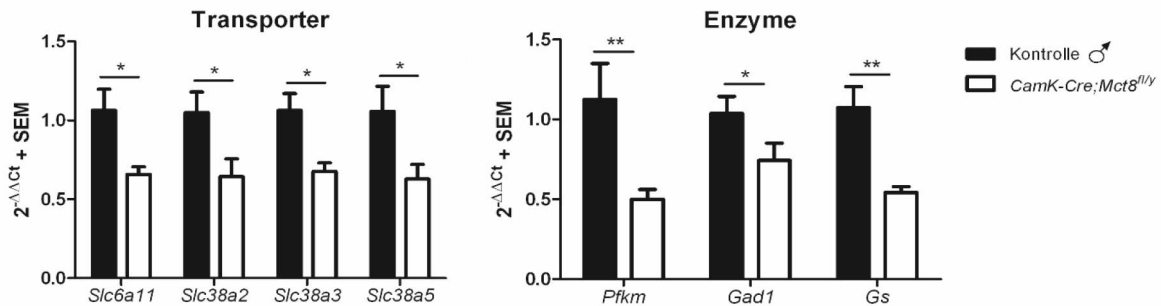


Abbildung 21: Genexpressionsanalysen im Cortex von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen deuten auf einen verlangsamten Metabolismus sowie eine reduzierte synaptische Aktivität hin. Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente Mäuse zeigen eine signifikant verringerte Expression des GABA-Transporters *Slc6a11* sowie der Glutamintransporter *Slc38a2*, *Slc38a3* und *Slc38a5*. Des Weiteren sind wichtige Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels wie die Phosphofruktokinase (*Pfkfb*), die Glutamatdecarboxylase 1 (*Gad1*) und die Glutaminsynthetase (*Gs*) signifikant im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern reduziert. Mittelwert + SEM, n=8. *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$ (Mann-Whitney-U Test).

Im Striatum von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen konnte ebenfalls nach ^{13}C NMR Analyse eine signifikant verringerte Laktatmenge detektiert werden. Daraufhin wurden die gleichen Glukose-, Laktat-, Glutamin-, Glutamat- und GABA-Transportergene und Enzyme, wie bereits im Cortex, im Striatum mittels qPCR untersucht. Insgesamt zeigten sich hier jedoch keine Änderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Lediglich der neuronal exprimierte Glukosetransporter *Glut3* und die *Pfkfb* sind tendenziell niedriger exprimiert (Daten nicht gezeigt).

3.3 Analyse des Energiestoffwechsels in primären *Mct8*-defizienten Astrozyten *in vitro*

SDH beeinflussen den Energiestoffwechsel. Die Rolle von *Mct8* in diesem Kontext wurde allerdings auf zellulärer Ebene bisher noch nicht analysiert. Durch die Etablierung und Optimierung eines definierten Serum-freien Kulturmediums für primäre Astrozyten, dem *Seahorse XF^e Flux Analyzer* und Expressionsstudien wurde im Folgenden der Einfluss von SDH in primären Astrozyten, mit und ohne Expression von funktionalem *Mct8*, auf den Energiestoffwechsel untersucht.

3.3.1 Charakterisierung *Mct8*-defizienter Astrozyten

Zur Charakterisierung isolierter primärer Astrozytenkulturen wurden zunächst Immunfluoreszenz-Färbungen mit Antikörpern gegen spezifische Astrozytenproteine, wie z.B. Gfap und Glast, und zur Lokalisation der *Mct8*-Expression in Wildtyp-Astrozyten durchgeführt. Die Zellen wurden insgesamt über sieben Tage (DIV7) kultiviert, wovon fünf Tage eine Kultivierung im definierten Serum-freien Medium mit 3nM T4 erfolgte (Abbildung 22). Es ist eine deutliche Färbung der Intermediärfilamente im Cytoplasma der Astrozyten mittels Gfap zu sehen sowie eine deutliche membranständige *Mct8*-Färbung, was zu einer starken Überlagerung beider Signale führt (siehe „merge“ obere Reihe). Die Färbung gegen Glast, als Astrozyten-spezifischer Glutamat-Aspartat-Transporter, der an der Entsorgung von Glutamat aus dem präsynaptischen Spalt beteiligt ist, zeigt eine deutliche membranständige Färbung und Signal-Überlagerung mit Gfap (siehe „merge“ untere Reihe).

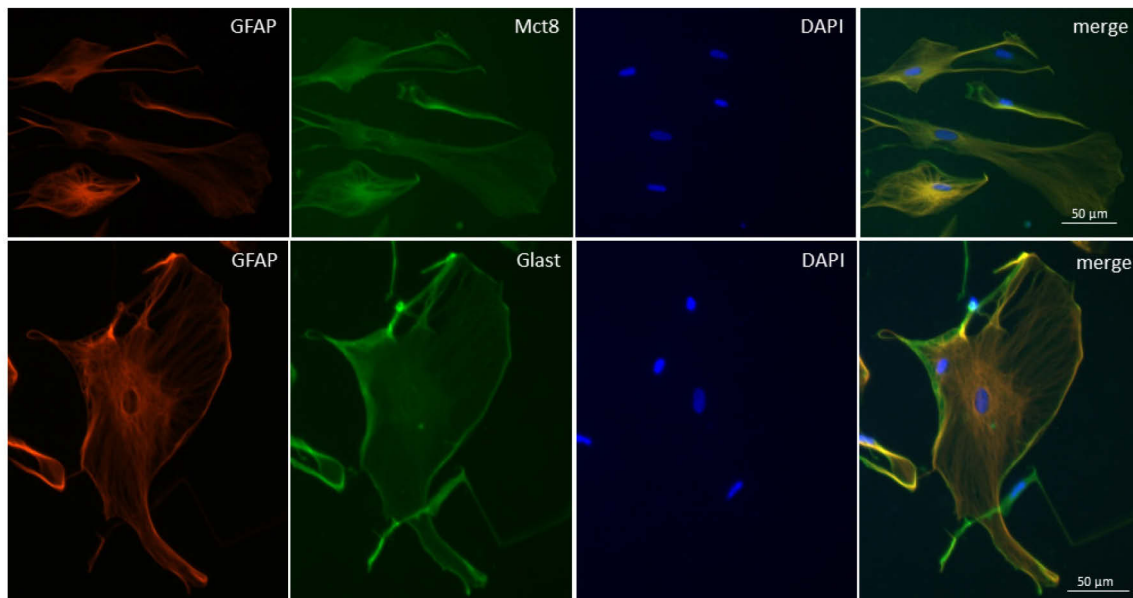


Abbildung 22: Immunhistochemische Antikörper-Färbungen in primären Wildtyp-Astrozyten (DIV7). Obere Reihe: Es ist eine deutliche membranständige *Mct8*-Färbung zu erkennen sowie eine Überlagerung von Gfap (Astrozyten-spezifischer Marker) und *Mct8* (siehe merge). Untere Reihe: Neben einer deutlichen Gfap-Färbung ist eine membranständige Färbung des Astrozyten-spezifischen Glutamat-Aspartat-Transporters (Glast) zu erkennen sowie deren Überlagerung. Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Zudem wurden primäre WT und *Mct8*-defiziente Astrozyten hinsichtlich ihrer SDH-Transporter- und Rezeptorexpression analysiert. Die in der immunhistochemischen Färbung gezeigte *Mct8*-Expression konnte auch auf Transkriptebene in WT Zellen, jedoch nicht in *Mct8*-defizienten Astrozyten, nachgewiesen werden, (Abbildung 23). Dies verdeutlicht, dass das Modell primärer WT und *Mct8*-defizienter Astrozyten verlässlich ist und für weitere Analysen genutzt werden kann. Neben *Mct8* exprimieren primäre Astrozyten beider Genotypen

weitere SDH-Transporter, wie zum Beispiel *Lat1* und *Lat2* und zu geringem Anteil *Mct10* (Abbildung 23). Zudem konnte in beiden Zellen eine gleichmäßige Expression beider SDH-Rezeptoren $TR\alpha$ und $TR\beta$ sowie des Plasmamembranrezeptors Integrin $\alpha_v\beta_3$ nachgewiesen werden (Abbildung 23).

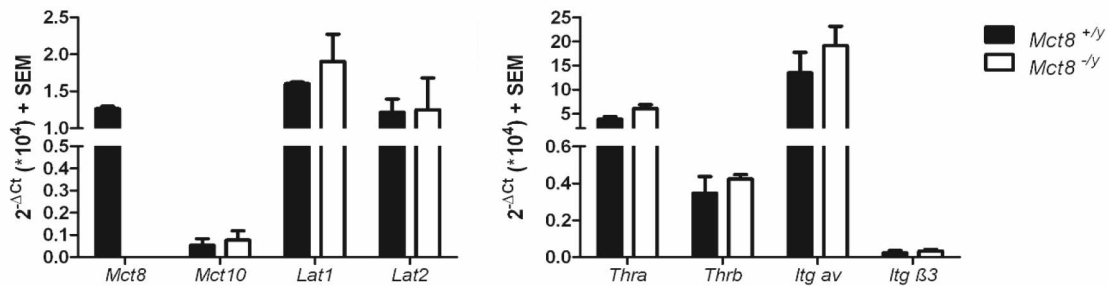


Abbildung 23: Expression verschiedener Schilddrüsenhormon-Transporter und -Rezeptoren in primären Wildtyp und *Mct8*-defizienten Astrozyten, kultiviert über 5 Tage mit 3nM T4. Die Expression wurde auf *18S* als *Housekeeper* normalisiert. In beiden Zelltypen konnte die Expression von *Lat1* und *Lat2* und zu geringerem Anteil von *Mct10* nachgewiesen werden. *Mct8*-defiziente Astrozyten zeigen keine *Mct8*-Expression. Zudem verfügen beide Zellen über die SDH-Rezeptoren $TR\alpha$ und $TR\beta$ sowie dem membranassoziierten Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor. Mittelwert + SEM, n=3.

Durch die Etablierung und Optimierung eines definierten Serum-freien Kulturmediums für primäre Astrozyten war es möglich, den Einfluss von SDH auf diese zu untersuchen. Die zelluläre Wirkung von physiologischen Konzentrationen an totalem T3 und T4 (3nM und 10nM) auf den Stoffwechsel der Zellen sollte durch die Zugabe von Albumin, als SDH-Bindeprotein, stabilisiert werden. Mittels LC-MS/MS Analytik konnten die jeweiligen eingesetzten SDH-Konzentrationen im nanomolaren Bereich bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), wobei die freie SDH-Konzentration nicht bestimmt werden konnte. Beim Vergleich mit der Literatur liegt diese jedoch im picomolaren (pM) Bereich (Schmohl et al. 2015).

3.3.2 Analyse des Energiestoffwechsels mittels *Seahorse XF^e Flux Analyzer* in *Mct8*-defizienten Astrozyten

Es ist bekannt, dass Schilddrüsenhormone den Energiestoffwechsel beeinflussen: sie steigern die basale Atmung, die ATP Produktion und regulieren die Expression wichtiger Stoffwechselenzyme der Atmungskette, wie zum Beispiel Untereinheiten der Cytochrom C Oxidase und die F1-Untereinheit der ATPase sowie mitochondriale Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel *Tfam* und *Nrf1* (Magnus-Levy 1895; Lanni et al. 1994; Weitzel et al. 2001; Garstka et al. 2003).

Parallel zu den *in vivo* Mausmodell-Studien wurde mittels des *Seahorse XF^e Flux Analyzer* der Energiestoffwechsel in primären Astrozyten *Mct8*-defizienter Mäuse untersucht. Anhand dieses

Assay sind Aussagen über wichtige Parameter der mitochondrialen Atmung möglich: basale und maximale Atmung, ATP Produktion und Umsatz, Reservekapazität und Protonenleck. Für alle Versuche wurden die Zellen insgesamt über sieben Tage kultiviert, wobei nach zwei Tagen die Umsetzung auf definierte Serum-freie Kulturmedien ohne SDH (w/o TH), mit 3nM und 10nM T3 bzw. T4 für weitere fünf Tage erfolgte. Die Seahorse-Messungen erfolgten bei 10mM Glukose und 2mM Glutamin als Substrat sowie den variierenden SDH-Konzentrationen im Assaymedium. Abbildung 24 A zeigt die Messung der basalen Atmung in primären WT versus *Mct8*-defizienten Astrozyten. WT Astrozyten zeigen über alle Behandlungen eine stabile Atmungsrate (*oxygen consumption rate*, OCR). *Mct8*-defiziente Astrozyten dagegen steigern tendenziell ihre basale Atmung im Vergleich zu WT Astrozyten bei Kultivierung mit 3nM T3 ($p=0,06$) und T4 ($p=0,09$). Die Steigerung der basalen Atmung geht mit einem Ansteigen des Protonenlecks, welches ca. 20% der basalen Atmung entspricht, einher (Abbildung 24 B). Die Kultivierung von WT Astrozyten mit 10nM T3 führt zu einem tendenziellen Anstieg des Protonenlecks. Für alle anderen Behandlungen konnten jedoch zwischen den Zelltypen keine signifikanten Änderungen gemessen werden. Es ist bereits bekannt, dass SDH die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran für Protonen beeinflussen, indem sie die Zusammensetzung der Phospholipidschicht ändern (Brand et al. 1992). Ein erhöhtes Protonenleck ist zudem auf die Expression von Entkoppler-Proteinen (engl. *uncoupling proteins*, UCPs) zurückzuführen. Diese sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und konnten als T3-regulierte Gene identifiziert werden (Lanni et al. 2003).

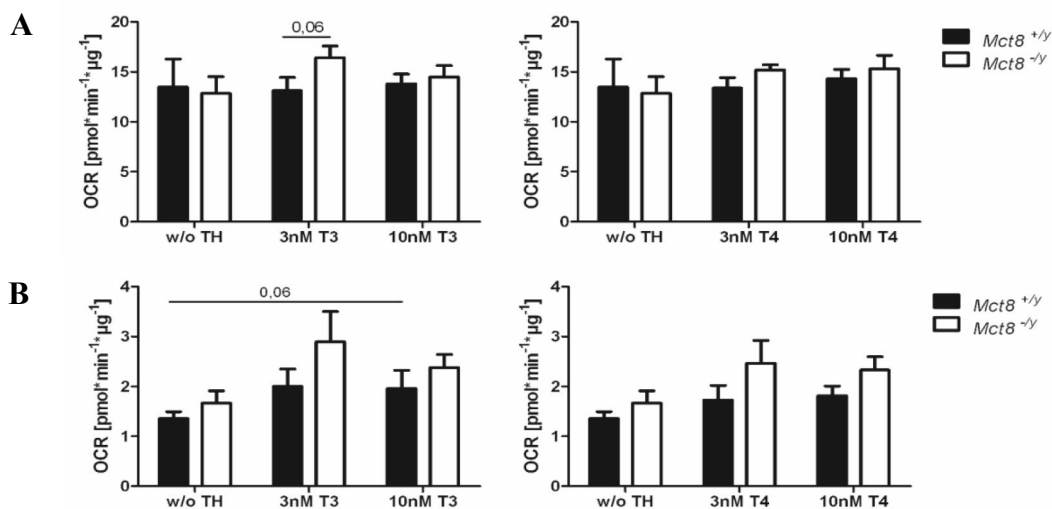


Abbildung 24: Wichtige Parameter der mitochondrialen Atmung in Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Astrozyten nach Langzeitkultivierung (5 Tage) mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). A) Die Behandlung mit 3nM T3 bzw. T4 führt zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der basalen Atmungsrate (OCR) in *Mct8*-defizienten Astrozyten. B) Das Protonenleck steigt ebenfalls in *Mct8*-defizienten Astrozyten mit ansteigenden T3- und T4-Konzentrationen, was auf eine mögliche Veränderung der Zellmembranzusammensetzung durch SDH zurückzuführen ist. Mittelwert + SEM, n=3.

Eine weitere wichtige Funktion des mitochondrialen Stoffwechsels ist der ATP Umsatz, welcher die basale Atmung stark kontrolliert. Nach Auswertung erhält man ein ähnliches Bild in beiden Zelltypen, wie für die basale Atmung (absolute OCR-Werte in Tabelle 18 zusammengefasst). Somit ist die tendenziell erhöhte OCR auf einen gesteigerten ATP Umsatz in *Mct8*-defizienten Astrozyten, bei Kultivierung mit 3nM T3 bzw. T4, zurückzuführen.

Durch die Zugabe von FCCP, als Entkoppler der Atmungskette, erlangt man Informationen über die maximale Atmung in Zellen, da diese unabhängig vom ATP Umsatz abläuft. Die beobachteten SDH-abhängigen Anstiege in der Atmungsrate, wie im Ruhezustand, sind nicht mehr zu messen (Tabelle 18). Dies bedeutet, dass unter Bereitstellung von 10mM Glukose und 2mM Glutamin als Energieäquivalente für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), beide Zelltypen eine ähnliche Elektronentransportaktivität und Substratoxidation aufweisen.

Die Reservekapazität beschreibt die Fähigkeit von Zellen durch Substratbereitstellung und Elektronentransport auf einen steigenden Energiebedarf reagieren zu können. Diese Funktion macht somit Aussagen, wie nah Zellen unter den gegebenen Bedingungen an ihrem bioenergetischen Limit arbeiten. In Tabelle 18 sind die absoluten OCR-Werte für alle Bedingungen zusammengefasst. Schilddrüsenhormone haben keinen Einfluss auf die Reservekapazität in WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten.

Tabelle 18: Zusammenfassung wichtiger Parameter der mitochondrialen Atmung in Wildtyp (WT)- und *Mct8*-defizienten Astrozyten (KO) nach Langzeitkultivierung (5 Tage) mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). Aufgelistet sind die absoluten OCR-Werte in [pmol/(min*µg)]. Mittelwerte ± SEM, n=3. Statistik mittels Mann-Whitney-U Test.

		w/o TH	3nM T3	10nM T3	3nM T4	10nM T4
ATP Umsatz	WT	10,6 ± 2,0	11,1 ± 1,2	11,8 ± 0,8	11,7 ± 1,0	12,3 ± 0,9
	KO	11,2 ± 1,7	13,5 ± 0,9	12,1 ± 1,2	12,7 ± 0,5	13,0 ± 1,3
<i>p</i> -Wert WT vs. KO		0,82	0,09	0,81	0,31	0,47
maximale Atmung	WT	32,2 ± 6,4	26,1 ± 3,1	26,4 ± 2,2	27,8 ± 2,4	30,4 ± 1,8
	KO	31,2 ± 2,8	32,6 ± 2,9	27,9 ± 4,4	26,5 ± 4,3	29,7 ± 3,6
<i>p</i> -Wert WT vs. KO		0,48	0,24	1,00	0,82	0,57
Reservekapazität	WT	18,8 ± 4,1	13,0 ± 3,5	12,6 ± 3,0	14,5 ± 3,1	16,0 ± 1,9
	KO	18,3 ± 1,6	16,2 ± 2,4	16,0 ± 3,1	11,3 ± 4,0	14,4 ± 3,4
<i>p</i> -Wert WT vs. KO		0,59	0,82	0,48	0,48	0,69

Abschließend wurde die Respirationskontrollrate (engl. *cell respiratory control ratio*, cRCR) als Maß für die mitochondriale OXPHOS in den Zellen bestimmt. Diese Funktion beschreibt

die Beziehung zwischen der Oxidation der Atmungskette und der mitochondrialen ATP-Synthese und ist somit abhängig von der maximalen Substratoxidation und dem Protonenleck. Über die Behandlungen zeigen sowohl WT, als auch *Mct8*-defiziente Astrozyten keine signifikanten Unterschiede, was bedeutet, dass beide Zelltypen bei T3- und T4-Langzeitkultivierung bzw. ohne SDH keine mitochondrialen Dysfunktionen aufweisen (Abbildung 25).

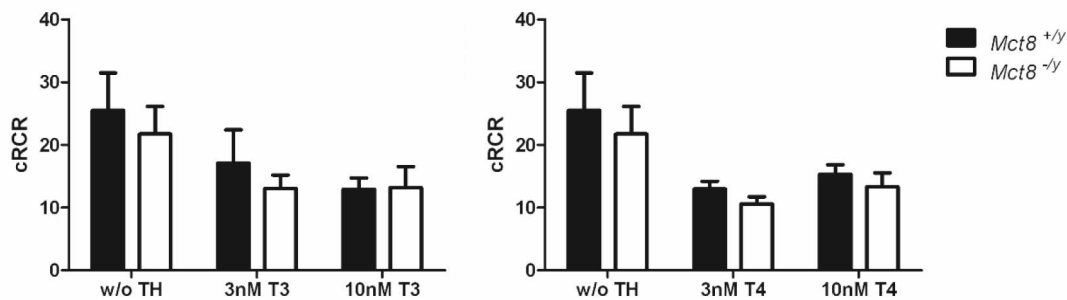


Abbildung 25: Mitochondriale OXPHOS-Kapazität in primären Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Astrozyten, kultiviert über 5 Tage mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). Die zelluläre Respirationskontrollrate (cRCR), errechnet als Quotient aus maximaler Atmung und Protonenleck, trifft Aussagen über die Kopplung von oxidativer Phosphorylierung und ATP-Synthese. Über alle Behandlungen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelltypen zu verzeichnen, was für eine funktionierende mitochondriale OXPHOS spricht. Mittelwert + SEM, n=3.

3.3.3 Analyse der Citratsynthase-Aktivität in *Mct8*-defizienten Astrozyten

Die Messung der Citratsynthase (CS)-Aktivität ist ein geeigneter Biomarker, um Rückschlüsse auf den Mitochondriengehalt in Geweben und Zellen zu erhalten (Larsen et al. 2012). *Mct8*-defiziente Astrozyten zeigen in allen analysierten Funktionen der mitochondrialen Atmungskette eine tendenzielle Erhöhung im Vergleich zu WT Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine erhöhte Mitochondrienmasse. Zellen beider Genotypen wurden, zur Vergleichbarkeit der bisherigen Ergebnisse, insgesamt 7 Tage kultiviert, wovon 5 Tage eine Langzeitkultivierung mit definiertem Serum-freiem Medium mit 3nM und 10nM T3 bzw. T4 sowie ohne SDH (w/o TH) beinhalteten. Nach Messung der Citratsynthase-Aktivität zeigt sich, dass *Mct8*-defiziente Astrozyten über alle T3- und T4-Behandlungen eine ähnliche CS-Aktivität aufweisen. Im Vergleich zum Wildtyp bei gleicher Behandlung, wie zum Beispiel 10nM T3 und 3nM T4, ist eine Erhöhung der CS-Aktivität in *Mct8*-defizienten Astrozyten messbar (Abbildung 26). Die Analyse der basalen und maximalen Atmung, dem ATP Umsatz und der Reservekapazität zeigte bei beiden Behandlungen eine Erhöhung in *Mct8*-defizienten Astrozyten. Insgesamt waren jedoch die beobachteten Effekte bei Behandlungen mit 3nM T3 stärker, was laut Messung der CS-Aktivität nicht auf eine erhöhte Mitochondrienmasse zurückzuführen ist. Bei einer Behandlung mit 3nM T4 lassen sich jedoch die erhöhten

OXPHOS-Parameter in *Mct8*-defizienten Astrozyten auf eine erhöhte CS-Aktivität zurückführen.

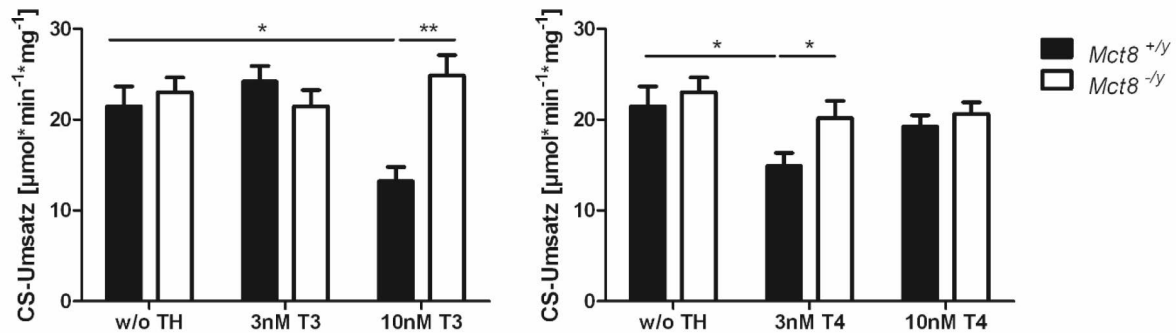


Abbildung 26: Messung der Citratsynthase-Aktivität in Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Astrozyten, kultiviert über 5 Tage mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne SDH (w/o TH). *Mct8*-defiziente Astrozyten zeigen kaum Änderungen in der CS-Aktivität über alle Behandlungen. 10nM T3 und 3nM T4 führen zu einer starken Reduktion der CS-Aktivität in WT Astrozyten. Mittelwert + SEM, n=3. *, p ≤ 0,05; **, p ≤ 0,01 (Mann-Whitney-U Test).

3.3.4 Analyse der Expression OXPHOS-relevanter Gene in *Mct8*-defizienten Astrozyten

Es ist bekannt, dass eine geringere Expression der einzelnen Komplexe der Atmungskette mit einer verringerten mitochondrialen OXPHOS-Kapazität assoziiert ist (Boudina et al. 2005). Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Erhöhung der oxidativen Phosphorylierung in *Mct8*-defizienten Astrozyten und deshalb wurden ausgewählte Gene der OXPHOS sowie Transkriptionsfaktoren auf ihre Gen- und Proteinexpression nach Langzeitkultivierung mit T3 und T4 bzw. ohne SDH untersucht. Folgende Kandidatengene der OXPHOS wurden analysiert: *Ndufb8* (Untereinheit (UE) NADH-Dehydrogenase, Komplex I), *Sdhb* (UE Succinat-Dehydrogenase, Komplex II), *Uqcrc2* (UE Cytochrom bc1-Komplex, Komplex III), *mt-Co1* (UE Cytochrom C Oxidase, Komplex IV, T3-reguliert) und *Atp5a1* (UE ATP-Synthase, Komplex V, T3-reguliert). Als essentieller mitochondrialer Transkriptionsfaktor von Atmungskettengenen wurde zudem *Tfam* untersucht sowie die Expression von *Ant* (*Adenine Nucleotide Transporter*: Export ATP aus Mitochondrienmatrix, Import ADP in Matrix). Tabelle 19 listet alle untersuchten Gene und deren relative Expression in WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten, kultiviert mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen. Die Genexpression wurde auf *18S* (*Housekeeper*) normalisiert sowie auf 3nM T3 bzw. 3nM T4 (euthyreote Situation) als Kontrolle bezogen. Insgesamt ist zu sagen, dass für keines der untersuchten OXPHOS-relevanten Gene signifikante Unterschiede zwischen WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten sowie zwischen den verwendeten SDH-Konzentrationen zu detektieren sind.

Tabelle 19: Relative Expression OXPHOS-relevanter Gene in Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Astrozyten (KO) nach Langzeitkultivierung (5 Tage) mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). Die Genexpressionsdaten sind als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte dargestellt. Mittelwert \pm SEM, n=3.

		w/o TH	3nM T3	10nM T3	w/o TH	3nM T4	10nM T4
<i>Ndufb8</i>	WT	0,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	1,3 \pm 0,2
	KO	1,2 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	1,5 \pm 0,4	1,4 \pm 0,5	0,9 \pm 0,1
<i>Sdhb</i>	WT	0,9 \pm 0,2	1,1 \pm 0,4	1,1 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	1,1 \pm 0,4	1,4 \pm 0,2
	KO	1,2 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	1,4 \pm 0,4	1,2 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3
<i>Uqcrc2</i>	WT	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,5 \pm 0,3
	KO	1,2 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	1,6 \pm 0,5	1,1 \pm 0,1
<i>mt-Co1</i>	WT	0,8 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	1,2 \pm 0,8	1,5 \pm 0,7	2,1 \pm 1,0
	KO	1,2 \pm 0,5	1,4 \pm 0,4	1,4 \pm 0,5	1,2 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	0,6 \pm 0,3
<i>Atp5a1</i>	WT	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,3
	KO	1,0 \pm 0,4	1,2 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	1,0 \pm 0,4	1,4 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2
<i>Ant</i>	WT	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3	1,4 \pm 0,1
	KO	0,9 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3	1,7 \pm 0,5	1,1 \pm 0,2	2,1 \pm 0,5	1,7 \pm 0,4
<i>Tfam</i>	WT	0,8 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2
	KO	1,4 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	1,5 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	1,9 \pm 0,9

Die Expression OXPHOS-relevanter Gene wurde zudem auf Proteinebene in WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten analysiert (Abbildung 27). Verwendet wurde hierfür ein AK-Cocktail, der sich aus fünf Proteinen der einzelnen Komplexe (CI bis CV) der Atmungskette zusammensetzt, welche eine wichtige Rolle für die Stabilität der einzelnen Komplexassemblierung einnehmen. Die Banden über 55 kDa sind unspezifisch. Die UE *Ndufb8* des Komplex I konnte weder in WT noch in *Mct8*-defizienten Astrozyten detektiert werden. Unabhängig von der SDH-Konzentration und dem Genotyp bleibt die Proteinexpression aller Komplex-UE gleich. Einzig für das mitochondrial-kodierte Protein *mt-Co1* ist eine deutliche Signalmindering bei der Behandlung mit 10nM T3 im WT und vor allem *Mct8*-defizienten Astrozyten zu verzeichnen. Als Untereinheit des IV. Komplexes der Atmungskette ist dieses Protein an der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser, unter Verbrauch von vier Elektronen aus Cytochrom C und Protonen, beteiligt. Eine signifikante Verringerung dieses Komplexes würde somit zu einer messbaren Reduktion der basalen und maximalen Atmungsrate unter Behandlung mit 10nM T3 führen. Da auf diesen Parametern jedoch keine Änderungen beobachtet wurden, handelt es sich hierbei eher um eine metabolische Flexibilität

in Astrozyten. Insgesamt passen die RNA- und Proteinexpressionsdaten zu den analysierten Parametern der mitochondrialen Atmung mittels *Seahorse XF[®] Flux Analyzer*.

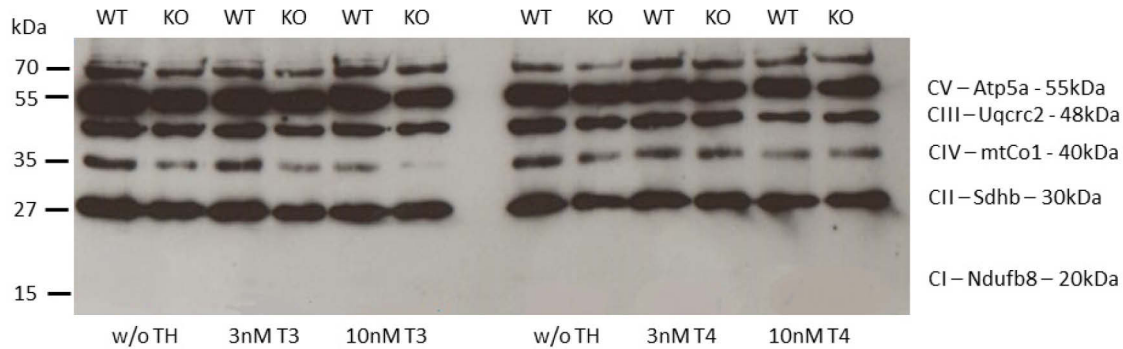


Abbildung 27: Proteinexpression wichtiger Komponenten der einzelnen OXPHOS-Komplexe (CI – CV) in Wildtyp (WT) und *Mct8*-defizienten (KO) Astrozyten nach Langzeitkultivierung (5 Tage) mit 3nM und 10nM T3/T4 bzw. ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). Insgesamt bleibt die Proteinexpression aller Komponenten, unabhängig von SDH-Konzentration und Genotyp, gleich. Lediglich die Behandlung mit 10nM T3 führt zu einer Signalreduktion in WT und besonders *Mct8*-defizienten Astrozyten für das Komplex IV-Protein mt-Co1, was jedoch keine Auswirkungen auf die Aktivität wichtiger OXPHOS-Parameter hat.

3.4 Analyse des Energiestoffwechsels in primären *Mct8*-defizienten Neuronen *in vitro*

Parallel zu den *in vitro* Energiestoffwechsel-Studien in primären *Mct8*-defizienten Astrozyten wurden die gleichen Analysen in primären *Mct8*-defizienten Neuronkulturen durchgeführt, um den Einfluss von SDH, mit und ohne funktionaler *Mct8*-Expression, zu untersuchen.

3.4.1 Charakterisierung *Mct8*-defizienter Neurone

Primäre Wildtyp-Neurone wurden insgesamt über 7 Tage (DIV7) kultiviert, wobei nach zwei Tagen auf ein Serum-freies Kulturmedium mit 3nM T3 umgesetzt wurde und anschließend neuronale Marker (Tau, NeuN) sowie die *Mct8*-Lokalisation mittels Antikörper-Färbungen nachgewiesen. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches somit zum Teil das neuronale Zytoskelett stabilisiert und entlang des Axon lokalisiert ist. Eine *Mct8*-Färbung ist im Zellsoma, entlang der Axone sowie in der Membran detektierbar. NeuN wurde als Neuron-spezifisches Kernprotein identifiziert (Mullen et al. 1992). Fast alle NeuN-positiven Zellen konnten mit dem *Mct8*-AK angefärbt werden, was zu einer deutlichen Signalüberlagerung im Zellsoma führt (Abbildung 28 „merge“).

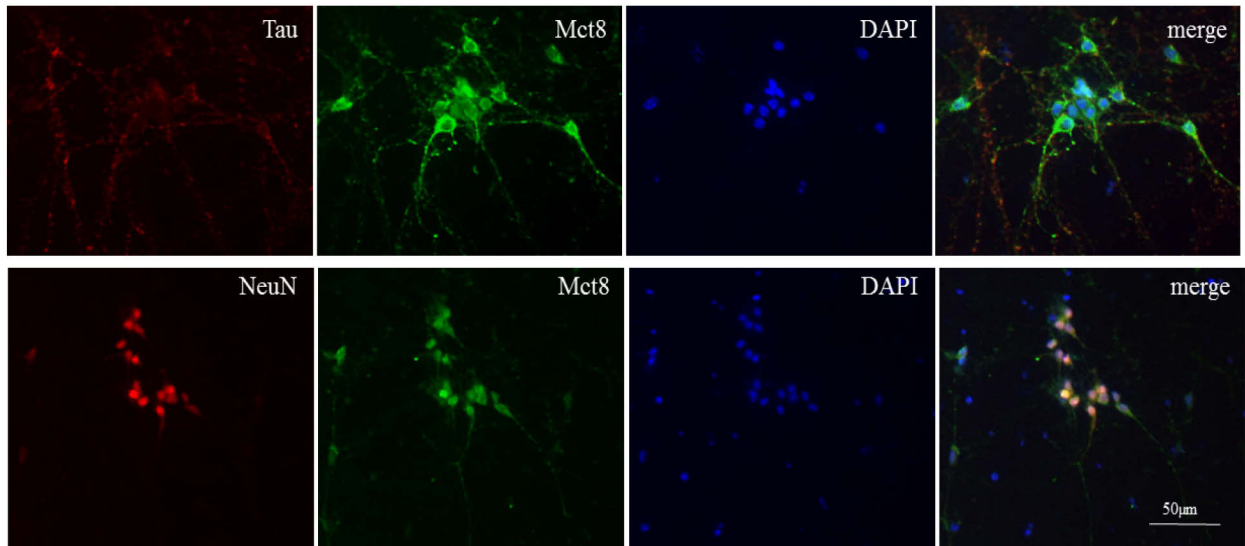


Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Färbung neuronaler Marker (Tau, NeuN) und Mct8 auf Wildtyp-Neurone (DIV7). Obere Reihe: Es ist eine deutliche Färbung gegen Mct8 zu erkennen sowie eine axonale Überlagerung von Tau (Mikrotubuli-spezifischer Marker) und Mct8 (siehe *merge*). Untere Reihe: Es ist eine Überlagerung von NeuN-positiven Zellen und Mct8 im Zellsoma zu erkennen. Maßstabsbalken entspricht 50µm.

Des Weiteren wurde die Expression verschiedener SDH-Transporter und –Rezeptoren mittels quantitativer PCR in WT und *Mct8*-defizienten Neuronen (DIV7) untersucht. *Mct8* konnte nur in den WT-Zellen detektiert werden. Weiterhin zeigt sich eine starke Expression des SDH-Transporters *Lat1*, sowie zu geringerem Maße von *Lat2* und *Mct10*. Sowohl WT, als auch *Mct8*-defiziente Neurone verfügen über beide SDH-Rezeptorformen TRα und zu geringerem Maße TRβ und exprimieren den membranassoziierten Integrin αvβ₃-Rezeptor (Abbildung 29).

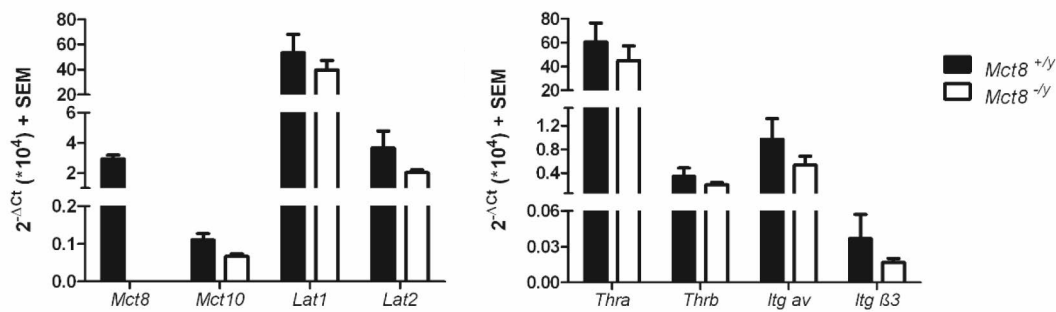


Abbildung 29: Expression verschiedener Schilddrüsenhormon-Transporter und –Rezeptoren in primären Wildtyp und *Mct8*-defizienten Neuronen, kultiviert über 5 Tage mit 3nM T₃. Die Expression wurde auf *18S* als *Housekeeper* normalisiert. In beiden Zelltypen konnte die Expression von *Lat1* und *Lat2* und zu geringerem Anteil von *Mct10* nachgewiesen werden. *Mct8*-defiziente Neurone zeigen keine *Mct8*-Expression. Zudem verfügen beide Zellen über die SDH-Rezeptoren TRα und TRβ sowie dem membranassoziierten Integrin αvβ₃-Rezeptor. Mittelwert + SEM, n=3.

Wie für die Kultivierung von primären Astrozyten wurde auch für primäre Neuronkulturen ein definiertes Serum-freies Kulturmedium etabliert und optimiert (Wirth et al. 2009; Roth et al. 2010b). Somit ist es auch in neuronalen Kulturen möglich, den Einfluss von SDH auf diese zu

untersuchen. Die Wirkung von niedrigen physiologischen Konzentrationen an totalem T3 und T4 (3nM und 10nM) auf den zellulären Stoffwechsel sollte durch die Zugabe von Albumin, als SDH-Bindeprotein, stabilisiert werden. Messungen frisch hergestellter Medien mittels LC-MS/MS Analytik bestätigten die jeweiligen eingesetzten SDH-Konzentrationen im nanomolaren Bereich (Daten nicht gezeigt). Wie bereits bei der Verwendung des Serum-freien definierten Mediums für primäre Astrozyten erwähnt, war es auch hier nicht möglich die freie Konzentration an SDH zu ermitteln. Auch in diesem untersuchten Modell ist die Annahme, dass keine Zugabe von SDH (w/o TH) einer hypothyreoten, 3nM T3/T4 einer euthyreoten und 10nM T3/T4 einer hyperthyreoten Situation in WT Neuronen entspricht. Genexpressionsanalysen T3-regulierter Gene, wie *Hairless (Hr)* und *Deiodase 3 (Dio3)*, zeigen, dass das definierte Serum-freie Medium physiologisch wirksam ist. Abbildung 30 zeigt, dass eine Langzeitinkubation mit 3nM T3 bzw. T4 zu einem Anstieg der *Hairless*-Expression in WT und *Mct8*-defizienten Neuronen führt (*Mct8* KO w/o TH vs. 3nM bzw. 10nM T3, $p=0,07$). Die *Dio3*-Expression, als Neuron-spezifisches, SDH-inaktivierendes Gen, wird bei zunehmender SDH-Konzentration hochreguliert, was im Falle von 10nM T3 in Richtung hyperthyreoten Zustand in WT Neuronen deutet. Eine Regulation in *Mct8*-defizienten Neuronen findet nicht statt, was bedeutet, dass in diesen Zellen die SDH-Aufnahme stark durch den *Mct8*-Verlust beeinträchtigt ist. Dieses Ergebnis bestärkt die Annahme, dass die direkte Zugabe von 10nM T3 als aktiven Metaboliten einer hyperthyreoten sowie eine Behandlung ohne SDH (w/o TH) einer hypothyreoten Situation im WT entspricht. Insgesamt ist die *Dio3*-Expression über alle Behandlungen in *Mct8*-defizienten Neuronen unverändert (Abbildung 30).

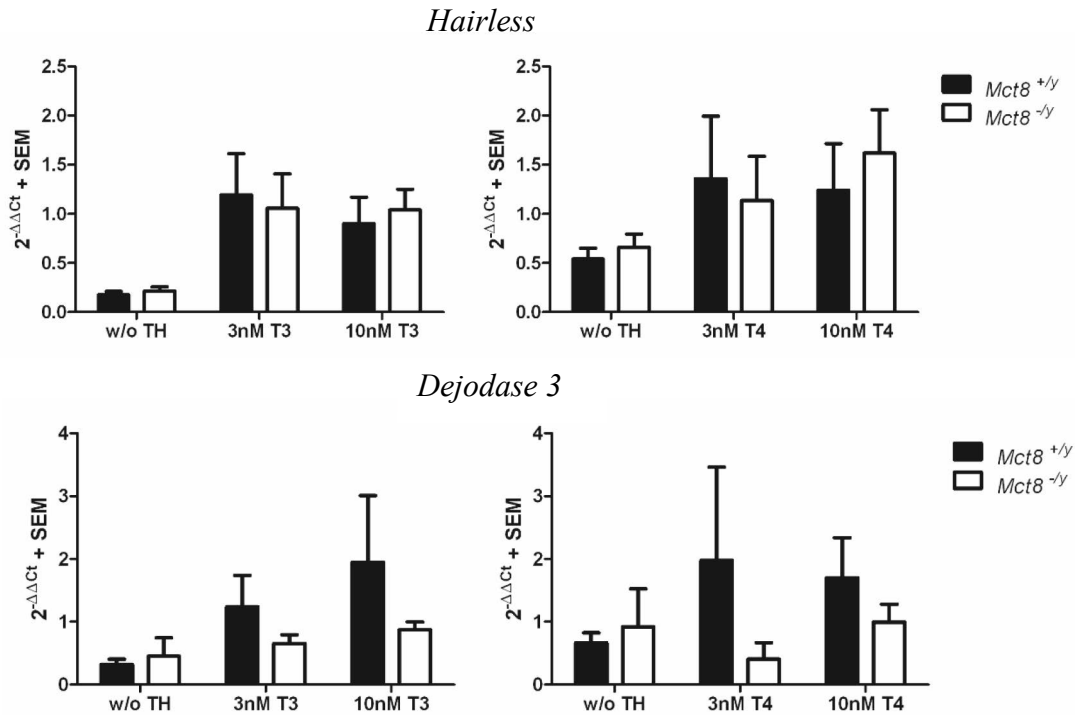


Abbildung 30: Expressionsnachweis T3-regulierter Gene in Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Neuronen, kultiviert über 5 Tage mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen bzw. ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). Es wurde auf *18S* (*Housekeeper*) normalisiert und auf 3nM T3 bzw. T4 als Kontrolle bezogen. Die *Hairless* (*Hr*)-Expression kann mit T3, als auch T4 in beiden Zelltypen erhöht werden. Die *Dio3*-Expression wird mit steigenden SDH-Konzentrationen in WT Neuronen hochreguliert. In *Mct8*-defizienten Neuronen erfolgt keine Regulation. Die Behandlung mit 10nM T3 als aktiven Metaboliten lässt, aufgrund der tendenziellen Hochregulation, eine hyperthyreote Situation in WT Zellen vermuten. Mittelwert + SEM, n= 3.

3.4.2 Analyse des Energiestoffwechsels mittels *Seahorse XF^e Flux Analyzer* in *Mct8*-defizienten Neuronen

Neurone sind hochenergetische Zellen und nehmen eine essentielle Rolle im zentralen Nervensystem ein, da sie für die Reizaufnahme sowie dessen Verarbeitung und Weiterleitung zuständig sind. Parallel zu den erhobenen Daten in primären Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Astrozyten wurde ebenfalls der Energiestoffwechsel in primären WT und *Mct8*-defizienten Neuronen mit Hilfe des *Seahorse XF^e Flux Analyzer* untersucht und die einzelnen Funktionen der OXPHOS berechnet. Durch die Kultivierung der Zellen in einem definierten, Serum-freien Medium ist es möglich, die T3- und T4-Konzentrationen individuell zu variieren und somit den Langzeiteinfluss auf die mitochondriale Atmung zu untersuchen. Für alle Versuche wurden die Zellen ohne SDH (w/o TH), mit 3nM und 10nM T3 bzw. T4 über fünf Tage kultiviert. Die Messungen erfolgten bei 10mM Glukose und 2mM Glutamin als Substrat im Assaymedium. Abbildung 31 A zeigt den Ruhezustand, gemessen als basale Atmung, in primären WT versus *Mct8*-defizienten Neuronen. Die Kultivierung mit T3 und T4 führt in WT Neuronen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg (w/o TH vs. 10nM T3, p=0,06; 3nM T3 vs. 10nM T3,

p=0,09; w/o TH vs. 10nM T4, p=0,09) der Atmungsrate (OCR). *Mct8*-defiziente Neurone sind ebenfalls in der Lage ihre OCR tendenziell mit T4 zu steigern (w/o TH vs. 3nM T4, p=0,09). Die Kultivierung mit 10nM T3 führt zudem zu signifikanten Unterschieden zwischen WT und *Mct8*-defizienten Neuronen. Insgesamt weisen *Mct8*-defiziente Neurone eine geringere basale Atmungsrate auf. Anhand des ATP Umsatz wird ersichtlich, dass *Mct8*-defiziente Neurone im Vergleich zum WT in der Lage sind bei Zugabe von 3nM T3 ihren ATP Umsatz signifikant zu steigern, dieser jedoch im Vergleich zum WT noch extrem verringert ist (Abbildung 31 B). In WT Neuronen ist ebenfalls eine Steigerung in Anwesenheit von 10nM T3 sowie zwischen 3nM T3 und 10nM T3 zu verzeichnen (p=0,06). Langzeitkultivierung mit 10nM T3 führt auch hier wieder zu signifikanten Unterschieden bezüglich des ATP Umsatzes zwischen beiden Zellgenotypen. Für eine Kultivierung mit 10nM T4 deutet sich ebenfalls eine Reduktion des ATP Umsatz in *Mct8*-defizienten Neuronen im Vergleich zu WT Neuronen an (p=0,09). Als weitere wichtige Funktion der mitochondrialen Atmung wurde die Reservekapazität, als Maß für das bioenergetische Limit der Zellen, dargestellt (Abbildung 31 C). Auch hier zeigen *Mct8*-defiziente Neurone insgesamt einen geringeren Sauerstoffverbrauch pro Minute als WT Neurone, welcher durch die Kultivierung mit T4 signifikant gesteigert werden kann. Auch hier zeigt sich eine tendenzielle Reduktion der Reservekapazität bei Kultivierung mit 10nM T4 zwischen beiden Zellgenotypen (p=0,09).

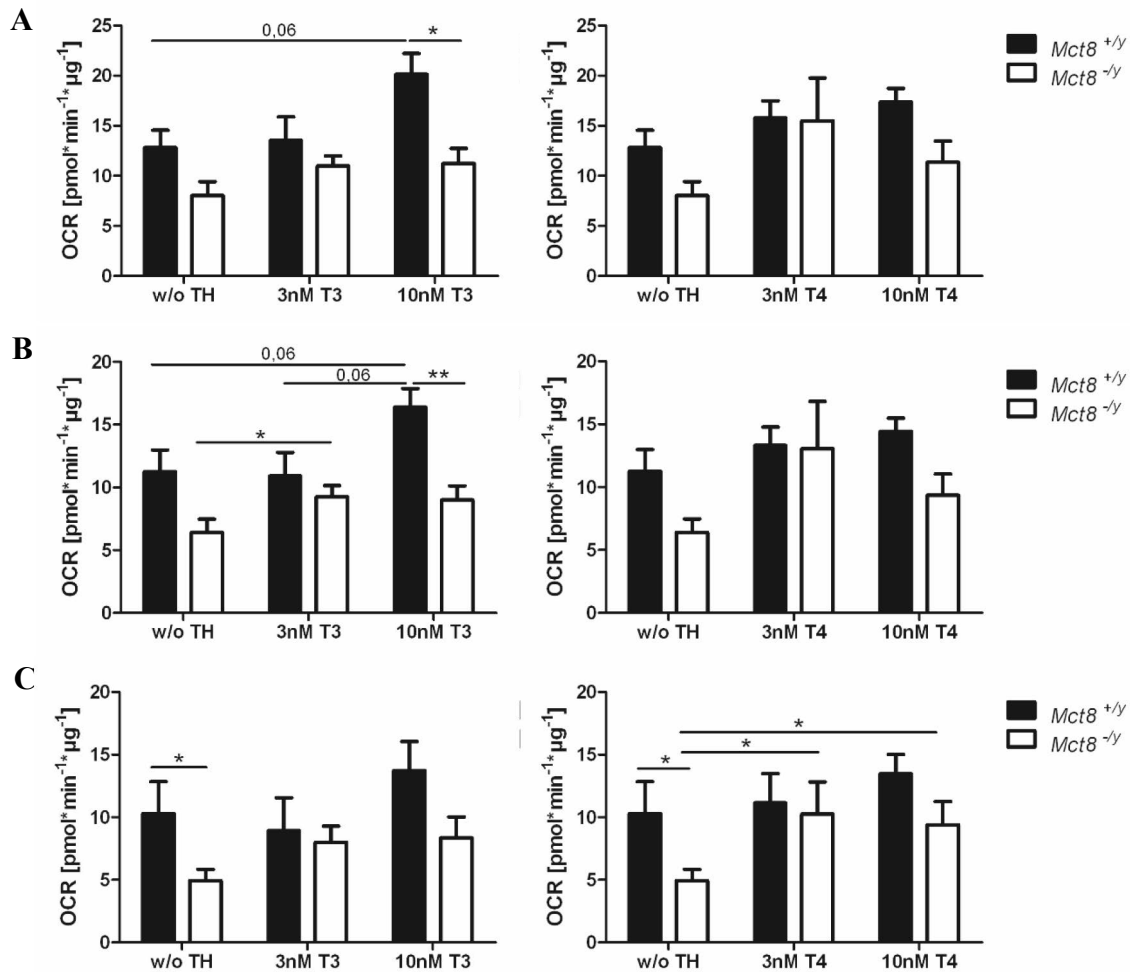


Abbildung 31: Wichtige Parameter der mitochondrialen Atmung in Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Neuronen nach Langzeitkultivierung (5 Tage) mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). A) Die Behandlung mit 3nM und 10nM T3 bzw. T4 führt zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der basalen Atmungsrate (OCR) in WT und *Mct8*-defizienten Neuronen. Die Behandlung mit 10nM T3 führt zu signifikanten Unterschieden zwischen beiden Zellgenotypen. Insgesamt ist die basale OCR in *Mct8*-defizienten Neuronen geringer. B) Der ATP Umsatz wird ebenfalls T3- und T4-konzentrationsabhängig in beiden Zellen gesteigert, ist jedoch in *Mct8*-defizienten Neuronen reduziert. C) Die Reservekapazität zeigt ebenfalls Unterschiede, steigt aber in WT und *Mct8*-defizienten Neuronen zu gleichen Teilen mit ansteigenden T3- und T4-Konzentrationen und führt in *Mct8*-defizienten Neuronen zu einer signifikanten Steigerung der Reservekapazität durch T4-Behandlung. Mittelwert + SEM, n=3. *, $p \leq 0,05$, **, $p \leq 0,01$ (Mann-Whitney-U Test).

Des Weiteren zeigt sich ein ähnlicher T3- und T4-abhängiger Verlauf, wie in Abbildung 31, für das Protonenleck und die maximale Atmung (absolute OCR-Werte in Tabelle 20 zusammengefasst). Besonders WT Neurone reagieren auf die Zugabe von 10nM T3 und T4 und steigern ihre maximale Atmungsrate im Vergleich zur hypothyreoten Situation (w/o TH vs. 10nM T3, *, $p \leq 0,05$; 3nM T3 vs. 10nM T3, $p=0,06$; w/o TH vs. 10nM T4, $p=0,09$). In *Mct8*-defizienten Neuronen führt diese Behandlung eher zu einer geringeren Steigerung der OCR (w/o TH vs. 3nM und 10nM T3 bzw. 3nM T4, $p=0,09$). Die Behandlung mit 10nM T3 führt zu signifikanten Unterschieden der maximalen Atmung zwischen WT und *Mct8*-defizienten Neuronen. Auch hier zeigt sich wieder, dass die Langzeitkultivierung mit 10nM T4 zu einer

Reduktion der maximalen Atmung in *Mct8*-defizienten Neuronen führt ($p=0,06$). Diese Ergebnisse deuten insgesamt auf eine hypothyreote Situation in *Mct8*-defizienten Neuronen im Vergleich zu WT Neuronen hin. Zum anderen zeigen diese Ergebnisse aber auch, dass sowohl WT als auch *Mct8*-defiziente Neurone in der Lage sind T4 direkt oder durch Verstoffwechselung in weitere SDH-Metabolite zu nutzen und Funktionen der OXPHOS in diesen Zellen zu regulieren.

Tabelle 20: Zusammenfassung wichtiger Parameter der mitochondrialen Atmung in Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Neuronen nach Langzeitkultivierung (5 Tage) mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). Aufgelistet sind die absoluten OCR-Werte in [pmol/(min*µg)]. Mittelwert \pm SEM, n=3. *, $p \leq 0,05$ (Mann-Whitney-U Test).

		w/o TH	3nM T3	10nM T3	3nM T4	10nM T4
Protonen-Leck	WT	1,6 \pm 0,5	2,6 \pm 0,6	3,7 \pm 0,7	2,5 \pm 0,4	2,9 \pm 0,4
	KO	1,6 \pm 0,4	1,7 \pm 0,1	2,2 \pm 0,5	2,4 \pm 0,6	2,0 \pm 0,5
<i>p</i> -Wert WT vs. KO		0,94	0,39	0,13	0,94	0,24
maximale Atmung	WT	23,1 \pm 4,1	22,4 \pm 4,3	33,9 \pm 2,8	26,9 \pm 3,8	30,8 \pm 2,7
	KO	13,0 \pm 2,3	19,0 \pm 2,2	19,6 \pm 2,9	25,7 \pm 6,3	20,8 \pm 3,9
<i>p</i> -Wert WT vs. KO		0,09	0,70	0,02 (*)	0,94	0,06

Die Respirationskontrollrate (cRCR), als Maß für die mitochondriale Phosphorylierungskapazität, wurde abschließend in WT und *Mct8*-defizienten Neuronen bestimmt. Diese Funktion wird kontrolliert durch die Substratoxidation und das Protonenleck. Trotz der detektierten geringeren maximalen Atmungsrate und dem Protonenleck in *Mct8*-defizienten Neuronen im Vergleich zu WT Neuronen können für die Respirationskontrollrate letztlich keine Unterschiede, sowohl zwischen den Zellen als auch über die verschiedenen T3- und T4-Langzeitinkubationen, detektiert werden (Abbildung 32). Dies spricht für eine funktionale Integrität der Mitochondrien über alle T3- und T4-Behandlungen in WT und *Mct8*-defizienten Neuronen.

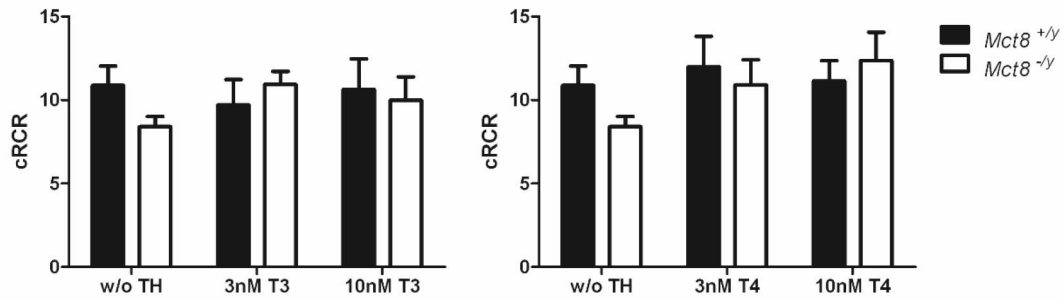


Abbildung 32: Mitochondriale OXPHOS-Kapazität in primären Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Neuronen, kultiviert über 5 Tage mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). Die zelluläre Respirationskontrollrate (cRCR), errechnet als Quotient aus maximaler Atmung und Protonenleck, trifft Aussagen über die Kopplung von oxidativer Phosphorylierung und ATP-Synthese. Über alle Behandlungen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellgenotypen zu verzeichnen, was für eine funktionierende mitochondriale OXPHOS spricht. Mittelwert + SEM, n=3.

3.4.3 Analyse der Citratsynthase-Aktivität in *Mct8*-defizienten Neuronen

Aufgrund der beobachteten Änderungen des Energiestoffwechsels zwischen primären WT und *Mct8*-defizienten Neuronen wurde auch hier die Citratsynthase-Aktivität, als Maß für die Mitochondrienmasse, gemessen. Anhand der Abbildung 33 wird ersichtlich, dass keine der beiden analysierten Zellgenotypen eine signifikant erhöhte bzw. erniedrigte Citratsynthase-Aktivität aufweisen. Somit können die Änderungen der OXPHOS-Parameter in *Mct8*-defizienten Neuronen nicht auf eine veränderte Mitochondrienmasse zurückgeführt werden.

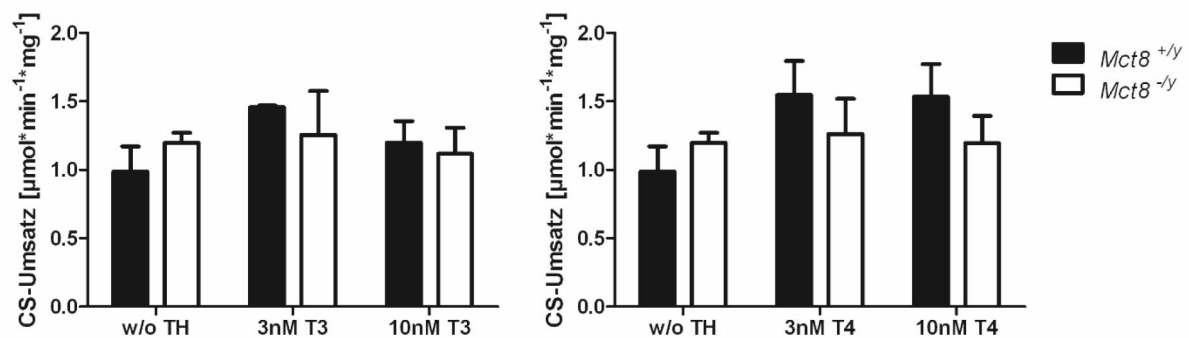


Abbildung 33: Messung der Citratsynthase-Aktivität in Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Neuronen, kultiviert über 5 Tage mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne SDH (w/o TH). Sowohl WT, als auch *Mct8*-defiziente Neuronen zeigen keine Änderungen in der CS-Aktivität über alle Behandlungen. Mittelwert + SEM, n=2.

3.4.4 Analyse der Expression OXPHOS-relevanter Gene in *Mct8*-defizienten Neuronen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Erniedrigung wichtiger Funktionen der oxidativen Phosphorylierung in *Mct8*-defizienten Neuronen und deshalb wurden, wie für primäre Astrozyten ausgewählte Gene der OXPHOS, sowie Transkriptionsfaktoren, die mitunter als T3-regulierte Gene bekannt sind, auf ihre Gen- und Proteinexpression nach Langzeitkultivierung

mit T3 und T4 bzw. ohne SDH untersucht. Tabelle 21 listet alle untersuchten Gene und deren relative Genexpression in WT und *Mct8*-defizienten Neuronen, kultiviert mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen. Die Expression wurde auf *18S* (*Housekeeper*) normalisiert, sowie auf 3nM T3 bzw. 3nM T4 (euthyreote Situation) als Kontrolle bezogen. Insgesamt ist zu sagen, dass *Mct8*-defiziente Neurone eine tendenziell verringerte Genexpression (besonders das *mt-Co1*-Gen) über alle T3- und T4-Konzentrationen zeigen, diese jedoch in keinem der untersuchten Gene signifikant im Vergleich zum WT und zwischen den verwendeten SDH-Konzentrationen ist.

Tabelle 21: Relative Expression OXPHOS-relevanter Gene in Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Neuronen nach Langzeitkultivierung (5 Tage) mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen sowie ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). Die Genexpressionen sind als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte dargestellt. Mittelwert \pm SEM, n=3.

		w/o TH	3nM T3	10nM T3	w/o TH	3nM T4	10nM T4
<i>Ndufb8</i>	WT	1,4 \pm 0,5	1,2 \pm 0,5	1,5 \pm 0,7	1,1 \pm 0,4	1,3 \pm 0,5	1,9 \pm 0,7
	KO	0,9 \pm 0,2	1,0 \pm 0,5	1,0 \pm 0,5	0,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,3	0,9 \pm 0,3
<i>Sdhb</i>	WT	1,4 \pm 0,4	1,2 \pm 0,5	1,4 \pm 0,7	1,2 \pm 0,3	1,3 \pm 0,5	1,8 \pm 0,7
	KO	1,0 \pm 0,4	0,9 \pm 0,4	0,9 \pm 0,3	0,9 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2
<i>Uqcrc2</i>	WT	1,4 \pm 0,5	1,2 \pm 0,4	1,0 \pm 0,4	1,2 \pm 0,4	1,3 \pm 0,5	1,4 \pm 0,4
	KO	1,1 \pm 0,4	0,8 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	1,0 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1
<i>mt-Co1</i>	WT	1,7 \pm 0,6	1,5 \pm 0,7	2,8 \pm 2,2	2,0 \pm 0,7	1,4 \pm 0,6	4,3 \pm 2,2
	KO	1,1 \pm 0,3	0,8 \pm 0,4	0,7 \pm 0,4	1,3 \pm 0,4	0,7 \pm 0,2	1,6 \pm 0,7
<i>Atp5a1</i>	WT	0,9 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	1,0 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3
	KO	1,1 \pm 0,3	0,9 \pm 0,3	0,9 \pm 0,1	1,2 \pm 0,4	0,8 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2
<i>Tfam</i>	WT	1,5 \pm 0,5	1,2 \pm 0,4	1,6 \pm 0,8	1,1 \pm 0,4	1,3 \pm 0,5	2,0 \pm 0,9
	KO	1,2 \pm 0,4	1,0 \pm 0,5	0,9 \pm 0,4	0,9 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2

Die Expression OXPHOS-relevanter Gene wurde zudem auf Proteinebene überprüft (Abbildung 34). Verwendet wurde hierfür ein AK-Cocktail, der aus fünf Proteinen der einzelnen Komplexe (CI bis CV) der Atmungskette besteht, welche eine wichtige Rolle für die Stabilität der einzelnen Komplexassemblierung einnehmen. Die Banden über 55kDa sind unspezifisch. Bei einer Behandlung ohne SDH (w/o TH) lässt sich für alle fünf spezifischen Protein-UE eine geringere Expression detektieren, die teilweise in den *Mct8*-defizienten Neuronen noch schwächer ist (*Ndufb8*, *mt-Co1*). Durch Langzeitkultivierung mit 3 und 10nM T3 bzw. T4 wird die Expression aller fünf untersuchten Proteine in beiden Zelltypen deutlich

gesteigert. Unterschiede zwischen Wildtyp und *Mct8*-defizienten Neuronen werden für die Komponenten des Komplexes III und IV (Uqcrc2 und mt-Co1) ersichtlich. Hier zeigt sich für *Mct8*-defiziente Neurone eine geringere Bandenintensität (Abbildung 34). Eine Reduktion deutete sich bereits auf RNA-Ebene für beide Gene an. Somit können die beobachteten verringerten Parametern der mitochondrialen Atmung, wie ATP Umsatz und Reservekapazität, in *Mct8*-defizienten Neuronen auf eine verringerte RNA- und Proteinexpression wichtiger Komponenten der einzelnen OXPHOS-Komplexe zurückgeführt werden.

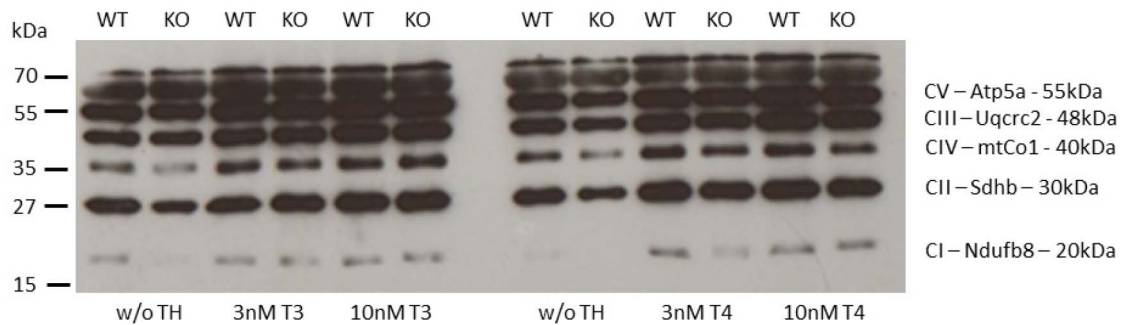


Abbildung 34: Proteinexpression wichtiger Komponenten der einzelnen OXPHOS-Komplexe (CI – CV) in Wildtyp (WT) und *Mct8*-defizienten (KO) Neuronen nach Langzeitkultivierung (5 Tage) mit 3nM und 10nM T3/T4 bzw. ohne Schilddrüsenhormone (w/o TH). Die Behandlungen mit 3nM und 10nM T3 und T4 führen zu einem deutlichen Anstieg der Signalintensität für alle untersuchten Proteine. Expressionsunterschiede sind vor allem für mt-Co1 und Uqcrc2 zwischen den Genotypen zu erkennen. Hier zeigen *Mct8*-defiziente Neurone eine geringere Intensität als WT Neurone.

4 DISKUSSION

Schilddrüsenhormone (SDH) sind bereits ab der pränatalen Phase an der korrekten Entwicklung des Organismus essentiell beteiligt. Über eine Bindung an die nukleären Schilddrüsenhormonrezeptoren TR α und TR β , welche als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren fungieren, regulieren SDH die Gentranskription. Dazu müssen sie, als geladene Aminosäurederivate, die Zellmembran passieren. Mit der Entdeckung von SDH-Transmembrantransportern in den 1970er Jahren wurde das Paradigma, das SDH durch passive Diffusion in ihre Zielzellen gelangen, widerlegt (Krenning et al. 1978; Eckel et al. 1979). Seitdem wurden zahlreiche SDH-Transporter identifiziert und deren Wichtigkeit in der Aufnahme und Abgabe von SDH in Zielzellen verschiedenster Gewebe von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (zusammengefasst in Schweizer et al. (2014)). Unter diesen konnte der Monocarboxylattransporter 8 (MCT8) als spezifischer T3- und T4-Transporter identifiziert werden (Friesema et al. 2003). Durch die Identifizierung von *MCT8*-Mutationen (Dumitrescu et al. 2004; Friesema et al. 2004) und deren Verbindung zum bereits 1944 beschriebenen Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) (Schwartz et al. 2005), eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung, charakterisiert durch schwere psychomotorische Retardierung, nahm die Untersuchung von SDH-Transportproteinen im Feld der Endokrinologen verstärkt zu (Biebermann et al. 2005; Friesema et al. 2006). AHDS-Patienten leiden unter schwerer mentaler Retardierung und Muskelhypotonie. Außerdem zeigen sie ein abnormales SDH-Profil: stark erhöhte T3-Konzentrationen, erniedrigte T4- und normale bis leicht erhöhte TSH-Konzentrationen. Das globale *Mct8*-defiziente Mausmodell, als mögliches murines Modell des humanen AHDS-Phänotyps, wurde generiert und charakterisiert (Dumitrescu et al. 2006; Trajkovic et al. 2007; Wirth et al. 2009). Es repliziert den endokrinologischen, aber nicht den neurologischen AHDS-Phänotyp. Die Aufnahme von T3 in das Gehirn *Mct8*-defizienter Mäuse ist stark reduziert, die T4-Aufnahme dagegen ist normal (Trajkovic et al. 2007). Um ein adäquates T3-Niveau aufrechtzuhalten, ist die Dejodase 2 (Dio2)-Aktivität induziert und die Dejodase 3 (Dio3)-Aktivität reprimiert, was prinzipiell für eine hypothyreote Situation im murinen Gehirn spricht (Trajkovic et al. 2007). Verhaltensstudien zeigten jedoch, dass es zu regionalen Unterschieden der SDH-Verfügbarkeit im *Mct8*-defizienten Gehirn kommt, da sowohl Auffälligkeiten identifiziert wurden, die einem hypo-, als auch hyperthyreoten Zustand des Gehirns entsprechen (Wirth et al. 2009). Eine mögliche Hypothese ist, dass der beeinträchtigte SDH-Transport, speziell von T3 in Neurone, für die Ausprägung mentaler Retardierung verantwortlich ist. Die T3-Konzentration im Gehirn wird durch zwei lokale Mechanismen aufrechterhalten. Zum einen findet die Zufuhr von SDH vom Blut über

spezifische T3-/T4-Transporter (*Mct8*, *Oatp1c1*, *Lat2*) in der Blut-Hirn-Schranke und über die Membranen der Zielzellen statt. Zum anderen wird die lokale T3-Konzentration durch die Produktion von T4 zu T3 durch die *Dio2* und der weitere Abbau zu 3,3'-T2 durch die *Dio3* reguliert. Bereits 1985 untersuchten Van Doorn *et al.* mit Hilfe von unterschiedlich radioaktiv-markierten Tracern (^{125}I -T4, ^{131}I -T3) deren Verteilung in 34 Organen euthyreoter Ratten, wodurch sie zudem Schlussfolgerungen auf die lokale T3-Produktion ziehen konnten. Im zerebralen Cortex konnten sie den höchsten Anteil berechnen (65% lokales T3 aus T4). In allen anderen untersuchten Organen (Leber, Lunge, Herz etc.) ist der Anteil an lokal produziertem T3 dagegen eher gering (van Doorn *et al.* 1985). Die Gruppe um Galton *et al.* zeigte anhand *Dio2*-defizienter Mäuse, dass diese Tiere mit normalen Serum-T3- und erhöhten T4-Konzentrationen, aber stark verringerten T3- und erhöhten T4-Konzentrationen im Gehirn, einen milden neurologischen Phänotyp aufzeigen. Somit spielt die Versorgung des Gehirns mit T3 (und T4) über das Blut neben der lokalen T3-Produktion ebenfalls eine wichtige Rolle in der SDH-Homöostase und der Entwicklung des Gehirns (Galton *et al.* 2007).

Trotz zahlreicher Studien ist die zerebrale Funktion von *Mct8* während der Entwicklung allein und im Vergleich mit anderen SDH-Transportern mittels Doppel-defizienten Mausmodellen (siehe 1.3.3) bisher noch nicht eindeutig geklärt. Zelltyp-spezifische *Mct8*-defiziente Mausmodelle sowie primäre neuronale und astrozytäre Kulturen *Mct8*-defizienter Mäuse sind unabdingbar und können Aufschluss über die Rolle von *Mct8* in der BHS sowie auf der zellulären Ebene geben. Um den neurologischen AHDS-Phänotyp besser zu verstehen, muss die Komplexität des Gehirns mit seinen verschiedenen Zelltypen berücksichtigt werden. In dieser Arbeit wurde ein konditionelles Neuron-spezifisches *Mct8*-defizientes Mausmodell (*CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*) hinsichtlich der zerebralen Genexpression und des Energiestoffwechsels *in vivo* untersucht. Zudem erfolgte die SDH-abhängige Analyse des Energiestoffwechsels und die Interaktion bezüglich des SDH-Transports und -Metabolismus in primären *Mct8*-defizienten Neuron- und Astrozytenkulturen *in vitro*. Die erhobenen Daten werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Das Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente Mausmodell im Vergleich zum globalen *Mct8*-defizienten Mausmodell

Die Generierung eines Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mausmodells bietet den Vorteil gegenüber dem konstitutiven *Mct8*-defizienten Mausmodell, dass molekulare und biochemische Veränderungen, die durch den Verlust von *Mct8* speziell nur in Neuronen

auftreten, nebst einer funktionalen, d.h. *Mct8*-exprimierenden BHS untersucht werden können. Aufgrund des spezifischen neuronalen *Mct8*-Verlustes wurden keine drastischen Änderungen des allgemeinen SDH-Metabolismus in diesem Mausmodell erwartet. Zudem exprimieren murine Neurone bereits in frühen Embryonalstadien weitere SDH-Transporter, wie Lat1 und Lat2, die bei der Kompensation des *Mct8*-Verlustes eine große Rolle spielen (Wirth et al. 2009; Braun et al. 2011a). Anhand eines Multi-Organ Western Blots konnte eine unveränderte Proteinexpression von Mct8 in der Schilddrüse, als SDH-produzierendes Organ, sowie in weiteren Organen der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen (HPT) Achse und auch in der Leber nachgewiesen werden. Die Charakterisierung von *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen beider Geschlechter bezüglich Größenwachstum, Körper- und Herzgewicht zeigt insgesamt keine Änderungen zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Untersuchungen der motorischen Koordination der Mäuse mittels Rotarod-Test zeigten ebenfalls keine Unterschiede. Die Analyse der SDH-Spiegel im Serum von drei Monate alten Tieren ergab geschlechterspezifische Unterschiede, da für männliche Mäuse ein leicht erhöhtes T3 bei normalem T4 im Serum und bei weiblichen Mäusen ein leicht erhöhtes T4 bei normalem T3 im Serum detektiert wurde. Im Alter von sechs Monaten konnten diese geringfügig signifikanten Änderungen jedoch nicht mehr gemessen werden. Die Regulation von zirkulierenden SDH unterliegt dem streng kontrollierten thyreotropen Regelkreis und deshalb wurden nach Detektion der leicht veränderten SDH-Konzentrationen weitere Hauptkomponenten der HPT-Achse untersucht. Jedoch konnten keine Änderungen der *Tshb*- und *Dio2*-Transkripte in Hypophysen von *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*- und Wildtyp-Mäusen beider Geschlechter detektiert werden. Zudem zeigten die Schilddrüsen dieser Tiere keine morphologischen Veränderungen in Follikelgröße oder Epithelhöhe. Somit können die veränderten SDH-Konzentrationen nicht auf eine übermäßige Stimulation der Schilddrüse zurückgeführt werden und die Regulation der HPT-Achse läuft weitestgehend unverändert in *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen beider Geschlechter ab. Im Vergleich dazu wurden in *Mct8^{-y}*-Mäusen stark erhöhte T3- und erniedrigte T4-Serumkonzentrationen sowie erhöhte TSH-Konzentrationen detektiert (Dumitrescu et al. 2006; Trajkovic et al. 2007). Der grundlegende Mechanismus dieser abnormalen SDH-Konzentrationen konnte jedoch bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Mittels eines TSH-Suppressionstest konnte die Gruppe um Dumitrescu *et al.* zeigen, dass in *Mct8^{-y}*-Mäusen eine Resistenz gegenüber T3 und T4 vorliegt, welche möglicherweise durch den *Mct8*-Verlust in regulatorischen Zellen der HPT-Achse vermittelt wird (Dumitrescu et al. 2006; Di Cosmo et al. 2009). Trajkovic *et al.* zeigten zudem, dass die erhöhte *Trh*-Expression in *Mct8^{-y}*-Mäusen nur doch hohe T4, jedoch nicht durch eine Injektion hoher T3-

Konzentrationen supprimiert werden kann. Dies zeigt zum einen, dass die Trh-Neurone im paraventriculären Nukleus in der Lage sind auf lokal produziertes T3 zu reagieren und zum anderen auch eine Mct8-abhängige T3-Aufnahme in diese Zellen (Trajkovic et al. 2007). Die Leber *Mct8*-defizienter Mäuse zeigt eine normale T3-/T4-Aufnahme, einen Anstieg des T3-/T4-Gehaltes und eine erhöhte Dio1-Aktivität, was in einem hyperthyreoten Zustand dieses Organs resultiert und ein Grund für die erniedrigten T4-Serumspiegel sein könnte (Dumitrescu et al. 2006; Trajkovic et al. 2007). Die Gruppe um Liao *et al.* untersuchte daraufhin die Rolle der *Dio1* und/oder *Dio2* in *Mct8*-Defizienz mit Hilfe von globalen Doppel-knockout Mausmodellen. Sie zeigten, dass die parallele Inaktivierung von *Mct8* und *Dio1* zu einer fast vollständigen Regenerierung der SDH-Serumspiegel auf das Kontrollniveau führt. Daraus schlussfolgerten sie, dass die erhöhten T3- bzw. erniedrigten T4-Serumspiegel in *Mct8*-Defizienz auf eine erhöhte Konversion von T4 zu T3, katalysiert durch Dio1, zurückzuführen sind (Liao et al. 2011). Mit Hilfe eines konditionellen Mausmodells war es unserer Arbeitsgruppe möglich, diese Hypothese anhand eines Leber-spezifischen Dio1-Verlustes in *Mct8*-Defizienz (*Alb-Cre; Trsp^{fl/fl}; Mct8^{-/-}*) zu überprüfen. Die Analyse der Tiere ergab, dass sich die zirkulierenden SDH-Konzentrationen trotz einer inaktiven Dio1 nicht normalisieren bzw. ändern und somit andere Organe, wie zum Beispiel die Niere, an diesem Prozess beteiligt sein könnten (Wirth et al. 2015). Die Dio1-Aktivität in der Leber von *CamK-Cre; Mct8^{fl/fl}*-Mäusen zeigt ebenfalls keine Veränderungen im Vergleich zu ihren WT-Wurfgeschwistern beider Geschlechter, was aufgrund der gering veränderten zirkulierenden SDH-Parameter erwartet wurde. Es zeigt sich jedoch deutlich eine um 30% verringerte Dio1-Aktivität in weiblichen WT und *CamK-Cre; Mct8^{fl/fl}*-Mäusen. Dieser Geschlechtsdimorphismus konnte bereits 2006 für die Dio1-Aktivität in Mäusen nachgewiesen werden (Riese et al. 2006).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass das *CamK-Cre; Mct8^{fl/fl}*-Mausmodell genutzt werden kann, um den neuronalen Einfluss von *Mct8*, nebst einer funktionalen *Mct8*-exprimierenden BHS sowie weitestgehend unabhängig von veränderten zirkulierenden SDH-Parametern hinsichtlich des SDH-Transports und –Metabolismus im Gehirn zu untersuchen.

4.2 Gehirnpheotyp Neuron-spezifischer *Mct8*-defizienter Mäuse im Vergleich zum globalen *Mct8*-defizienten Mausmodell

Schilddrüsenhormone sind wichtige Regulatoren der korrekten Gehirnentwicklung. Trotz der stark veränderten SDH-Parameter in AHDS-Patienten, als auch in *Mct8*-defizienten Mäusen, zeigen diese jedoch keine klassischen Anzeichen einer angeborenen Hypothyreose bzw.

Kretinismus im Gehirn. Im *Mct8*-defizienten Mausmodell ist die Reifung der Purkinje-Zellen und die Verzweigung von Dendriten im Cerebellum normal (Trajkovic et al. 2007; Morte et al. 2010). Ebenso sind keine strukturellen Beeinträchtigungen hinsichtlich der Zellmigration zur korrekten Ausbildung der kortikalen Schichten sowie im Hippocampus zu verzeichnen. Die Anzahl der Parvalbumin- und Calretinin-positiven Interneurone ist ebenfalls unverändert (Wirth et al. 2009). Erstmals 2014 wurden anhand von *post mortem* durchgeführten histopathologischen Untersuchungen des Gehirns eines 30 Wochen alten *MCT8*-defizienten Fetus sowie eines 11 Jahre alten AHDS-Patienten strukturelle Veränderungen gezeigt (Lopez-Espindola et al. 2014). Im *Mct8*-defizienten Fetus kam es zu einer verzögerten kortikalen und zerebralen Entwicklung und Myelinisierung sowie zu einem Verlust Parvalbumin-exprimierender Interneurone und einer gestörten Purkinje-Zellen-Differenzierung. Die verzögerte Myelinisierung manifestierte sich im 11-Jährigen zu einer Hypomyelinisierung sowie veränderten Kleinhirnstrukturen und Parvalbumin-Expressionen (Lopez-Espindola et al. 2014). Diese Beobachtungen sind mit einer chemisch-induzierten Hypothyreose im sich entwickelnden Nager-Gehirn vergleichbar (Guadano Ferraz et al. 1994; Berbel et al. 1996), jedoch nicht eindeutig mit den klassischen Anzeichen einer angeborenen Hypothyreose.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Verlustes von *Mct8* speziell in Neuronen in adulten Mäusen untersucht. Zunächst konnte eine deutliche Reduktion der *Mct8*-Expression in den Neuronen des somatosensorischen *barrel field* im Cortex, ohne Beeinflussung der Gesamt-Neuronenanzahl, detektiert werden. Zudem zeigten sich in dieser Region keine Änderungen in der Expression von Interneuronmarkern, wie Parvalbumin, Calbindin und Calretinin. Bei einer SDH-Unterversorgung des Gehirns wären deutliche Veränderungen ersichtlich, wie zum Beispiel eine verringerte Anzahl von Interneuronen, verkümmerte Dendriten und axonales Wachstum sowie die Migration von cholinergen und Pyramiden-Zellen im Cortex und Purkinje-Zellen im Cerebellum wären verzögert (zusammengefasst in Bernal (2000)). Im globalen *Mct8*-defizienten Mausmodell konnten, wie bereits erwähnt, diesbezüglich auch keine zerebralen morphologischen Unterschiede bzw. Auffälligkeiten detektiert werden, obwohl diese Tiere eine stark verringerte T3- und T4-Konzentration im Prosencephalon zeigen (Müller et al. 2014). Die frühe Expression weiterer SDH-Transporter, wie zum Beispiel *Oatp14* und *Lat2*, nehmen im murinen *Mct8*-defizienten Gehirn in diesem Aspekt eine wichtige kompensierende Rolle ein (Wirth et al. 2009; Mayerl et al. 2014). Expressionsanalysen T3-regulierter Gene im Cortex von *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen im Vergleich zu gleichalten konstitutiv *Mct8*-defizienten Mäusen zeigen kaum signifikante Veränderungen. Die untersuchten Gene können zudem den einzelnen Gehirnzelltypen (Astrozyt, Neuron,

Oligodendrozyt) zugeordnet werden (Cahoy et al. 2008a). In der Literatur beschriebene SDH-Regulationen von *Hairless* (*Hr*) oder *Neurogranin* (*Rc3*) (Thompson et al. 2000; Morte et al. 2010) konnten allerdings nur teilweise im globalen *Mct8*-defizienten Mausmodell repliziert werden. Im männlichen *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mausmodell deutet sich eine gegensätzliche Regulation Astrozyten-spezifischer Gene im Vergleich zu *Mct8^{-/-}*-Mäusen an. So sind *Dio2*, *Slc1a3* (Glutamat-Aspartat Transporter) und *Aldh1a1* (Aldehyddehydrogenase Familie 1) im Cortex von Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen tendenziell niedriger, im globalen *Mct8* knockout tendenziell höher exprimiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass im neuronalen *Mct8*-defizienten Mausmodell die T3- und T4-Aufnahme in Neurone durch den *Mct8*-Verlust stark beeinträchtigt ist, es dadurch zu einer verzögerten T3-Abgabe durch den Astrozyten selbst und somit zu einer verstärkten T3-Akkumulation in diesen Zellen kommt. Dies wiederum führt zu einer Repression T3-regulierter Gene. Eine weitere Hypothese ist, dass neuronal-exprimierter *Mct8* neben der Aufnahme von SDH stärker an der Abgabe dieser beteiligt ist. Aufgrund des *Mct8*-Verlustes signalisieren Neurone im *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mausmodell Astrozyten einen euthyreoten Zustand, wodurch das T3 im Astrozyten akkumuliert bzw. in den Liquor abgegeben wird. Eine *Mct8*-vermittelte Aufnahme und Abgabe konnte bereits durch die Arbeitsgruppe um Prof. Ulrich Schweizer in primären WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten bestätigt werden (unpublizierte Daten). Eine Beteiligung von humanem MCT8 an der Abgabe von T3 und T4 aus Zellen konnte zudem kürzlich durch Johannes *et al.* mit Hilfe von stabil transfizierten hMCT8 MDCK-Zellen und LC-MS/MS Analytik bewiesen werden (Johannes et al. 2016). Messungen der SDH-Konzentrationen im Cortex dieser Mäuse würden zur Aufklärung beitragen, konnten jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Morte *et al.* untersuchten die Genexpression positiv- (werden durch T3 induziert, bei Hypothyreose unterdrückt) und negativ-regulierter T3 Gene (werden dagegen bei Hypothyreose induziert und durch T3 supprimiert) in Wildtyp, *Mct8* knockout, *Dio2* knockout und *Mct8/Dio2* Doppel-knockout Mausmodell. Sie schlussfolgerten, dass T3-positiv regulierte Gene (z.B. *Hr*, *Aldh1a1*) gleichermaßen von zirkulierenden und lokal produzierten T3-Konzentrationen beeinflusst werden. Negativ regulierte Gene (z.B. *Slc1a3*) sind jedoch gegenüber der *Dio2*-Aktivität sehr sensitiv und somit in ihrer Expression verstärkt von lokal produziertem T3 via *Dio2* abhängig (Morte et al. 2010). Auf transkriptioneller Ebene zeigt sich eine tendenzielle Erniedrigung der *Dio2*- und *Dio3*-Expression im Cortex männlicher *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren, in weiblichen Tieren ist die Expression dagegen ähnlich. *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäuse haben leicht erhöhte T3-Konzentrationen, vermutlich hat zirkulierendes T3 über die BHS einen größeren Einfluss auf die Genregulation,

als lokal via Dio2 produziertes T3. Hierfür sind allerdings funktionale Aktivitätstests der Dejodasen notwendig, da diese als Selenoenzyme in ihrer Expression und Aktivität zum einen stark vom Selengehalt der Zelle bzw. des Organs abhängig sind und zum anderen posttranskriptionale regulatorische Mechanismen Einfluss auf die Selenoproteinexpression nehmen (Riese et al. 2006). Die Ergebnisse sprechen aber für eine erhöhte Beteiligung zirkulierender SDH-Konzentrationen auf die Genexpression, die sich jedoch auf Astrozyten-spezifische Gene beschränkt. Dies bestärkt zum einen die Hypothese, dass Astrozyten aktiv Neurone mit SDH versorgen. Zum anderen zeigt dies auch, dass Neurone ihren SDH-Status an Astrozyten, als Versorgungszellen, signalisieren.

4.3 Zerebraler Energiestoffwechsel im neuronalen *Mct8*-defizienten Mausmodell *in vivo*

AHDS-Patienten weisen starke neurologische Defizite auf: kognitive Beeinträchtigungen, Muskelschwäche sowie Sprach- und psychomotorische Entwicklungsverzögerungen (Allan et al. 1944; Schwartz et al. 2007). Die grundlegenden fehlregulierten Mechanismen bei *MCT8*-Defizienz sind allerdings bisher ungeklärt. Es wird vermutet, dass die neurologischen Beeinträchtigungen aufgrund einer SDH-Unterversorgung wichtiger Zellen, wie Neuronen und Oligodendrozyten, während kritischer Phasen der Gehirnentwicklung auftreten. Diese Hypothese wird durch eine verzögerte Myelinisierung, wie sie in vielen AHDS-Patienten vorliegt, gestützt (Visser et al. 2011; Horn et al. 2013; Schweizer et al. 2013). Die Differenzierung von Oligodendrozyten und der damit verbundenen neuronalen Myelinisierung ist stark von SDH abhängig (Jones et al. 2003). Bisher sind nur wenige Daten bezüglich der SDH-Transporterexpression in Oligodendrozyten verfügbar, jedoch konnte *Mct8* in der murinen Oligodendrozyten-Zelllinie 158N auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen werden (Braun et al. 2011a). Somit ist es wahrscheinlich, dass *Mct8* ein wichtiger Regulator der Myelinisierung von Nervenzellen ist. Sein Verlust und der damit verbundene SDH-Mangel in Oligodendrozyten könnte ein Grund für die in AHDS-Patienten beobachtete verzögerte Myelinisierung sein. Die Gruppe um Prof. Samuel Refetoff untersuchte den SDH-Status vom Embryonaltag 17 (E17) bis zum postnatalen Tag 7 (P7) in *Mct8*-defizienten Mäusen (Ferrara et al. 2013). Hierbei zeigte sich, dass *Mct8*-defiziente Embryonen zum Gestationszeitpunkt E18 und P0 exzessiv erhöhte T4- und TSH-Serumkonzentrationen aufweisen, die sich bereits an P3 und P7 dem Wildtyp-Niveau angleichen und im adulten Tier zu den typischen verringerten T4- und leicht erhöhten TSH-Konzentrationen übergehen. Der transiente SDH-Überschuss spiegelt sich ebenfalls in den SDH-Konzentrationen in Cortex und Leber wider. Eine mögliche

Erklärung für die transiente Hyperthyroxinämie in *Mct8*-defizienten Mäusen wäre ein Anstieg der Expression alternativer SDH-Transporter, wie zum Beispiel Lat1, Lat2 und Oatp14, der zu einer erhöhten Aufnahme von SDH in die Zellen und zu einer verminderten Abgabe dieser durch den *Mct8*-Verlust führen würde (Ferrara et al. 2013). Diese Beobachtungen könnten somit auch den Einfluss auf die verzögerte Myelinisierung in *MCT8*-Defizienz erklären. Die Gruppe um Prof. Juan Bernal konnte anhand des *Mct8/Lat2*-Doppel-knockout Mausmodells zeigen, dass *Lat2* eine wichtige Rolle im frühen postnatalen Entwicklungsprozess (P0 bis P5) einnimmt, da dessen Verlust den *Mct8*-defizienten Effekt einer zerebralen kortikalen Hyperthyroxinämie unterdrückte (Nunez et al. 2014). Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt ist die Frage, ob *MCT8* noch andere, bisher unbekannte Substrate transportiert (James et al. 2009). Die Gruppe um Prof. Ulrich Schweizer zeigte anhand von Struktur-Funktionsanalysen, dass jedoch mindestens ein Jodatom an 3-Position des Phenol- und Tyrosylrings notwendig ist, um mittels MCT8 erkannt und in die Zellen transportiert zu werden (Kinne et al. 2010). Studien bezüglich des Einflusses von Hypothyreose auf den Gehirnstoffwechsel wurden mittels NMR-Spektroskopie in erwachsenen und jungen Ratten durchgeführt. In thyreidektomierten Ratten kommt es zu einer Acetat-Akkumulation nach Injektion von [1,2-¹³C] Acetat sowie zu einem reduzierten ¹³C-Einbau in wichtige Metabolite des Stoffwechsels (Glutamin (Gln), Glutamat (Glu), GABA). Der Anteil an nicht-markiertem Glu und GABA nimmt jedoch in diesen Tieren zu. Da der Acetat-Metabolismus dem astrozytären Stoffwechsel zugeordnet werden kann (Cerdan et al. 1990), zeigen diese Ergebnisse, dass ein SDH-Mangel diesen reduziert sowie folglich auch die Neuron-Astrozyten Interaktion bezüglich des Gln-Glu-GABA Zyklus beeinflusst (Chapa et al. 1995). Angeborene Hypothyreose in Ratten führt ebenfalls zu einer Reduktion des ¹³C-Einbaus in Metabolite des Neurotransmitterstoffwechsels (GABA, Glu, Gln) nach ¹³C-markierter Glukoseinjektion (Martinez et al. 2009). Die beobachteten geringeren T3- und T4-Konzentrationen im *Mct8*-defizienten Vorderhirn (Müller et al. 2014) könnten, im Zusammenhang mit den Daten von Chapa *et al.* und Martinez *et al.*, auf eine Repression des Energiestoffwechsels hindeuten. Diese Hypothese wurde bisher nur von zwei Arbeitsgruppen im Menschen und der Maus mit *MCT8*-Defizienz untersucht. Zwei Patienten mit Mutationen im *MCT8*-Gen (G564A, delF501) und den typischen abnormalen SDH-Serumkonzentrationen wurden MRI (Magnetresonanztomographie) und ¹H NMR Analysen im Alter von 8 und 28 Monaten (Patient 1) bzw. 10 und 17 Monaten (Patient 2) unterzogen. Sie zeigten beide Myelinisierungsverzögerungen im bildgebenden MR. *In vivo* ¹H NMR Analysen unterstützten die beobachteten Myelinisierungsdefekte, da erhöhte Cholin- sowie verringerte N-Acetylaspartat (NAA)-Konzentrationen gemessen wurden, Indikatoren für Fehl-

Myelinisierung und Schädigung von Neuronen im Gehirn (Sijens et al. 2008). Diese Veränderungen wurden auch in MR-Studien hypothyreoter Patienten beobachtet (Gupta et al. 1995). Interessanterweise zeigte Patient 1, mit nicht so stark erhöhter T3-Serumkonzentration, schwerwiegendere zerebrale Veränderungen. Somit scheinen veränderte SDH-Konzentrationen nicht allein für die beobachteten Veränderungen verantwortlich zu sein. Dies unterstützt wiederum die Hypothese, dass *MCT8* weitere, bisher unbekannte Substrate transportiert, die für eine korrekte Gehirnentwicklung von Bedeutung sind. Eine weitere Erklärung hierfür könnte aber auch eine stabilere Expression der *MCT8*-Mutante G654A in der Hypophyse, als in Neuronen oder der BHS sein.

In vivo durchgeführte ^1H NMR Messungen im Cortex und Striatum von Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen in Kooperation mit Prof. Juan Bernal und Prof. Sebastian Cerdan (IIB-UAM, Madrid Spanien) zeigen keine Änderungen für die in Hypothyreose beschriebenen regulierten Metabolite Cholin und NAA (Sijens et al. 2008) im Vergleich zu Kontrolltieren. Aufgrund der unveränderten SDH-Konzentrationen im Serum dieser Mäuse wurden allerdings auch keine Änderungen für diese Metabolite erwartet.

Die Arbeitsgruppe um Prof. Juan Bernal untersuchte mittels ^{13}C markierter Glukoseinfusion und NMR-Analysen den Gehirn- und Neurotransmitterstoffwechsel *Mct8*-defizienter Mäuse. Mit Hilfe der ^{13}C NMR Spektroskopie ist es möglich, Aussagen über die Aktivität des zerebralen Citratzyklus und des transzellulären Glutamin-Glutamat-GABA Zyklus zu treffen (Rodrigues et al. 2013b). Hierfür wird [$1\text{-}^{13}\text{C}$] markierte Glukose, als Substrat, über die Halsvene in das Gehirn injiziert und der Einbau des markierten Kohlenstoffs in die einzelnen Metabolite des Energiestoffwechsels verfolgt. Die Analysen *Mct8*-defizienter Mäuse zeigten einen erhöhten ^{13}C -Einbau in die Neurotransmitter Glu, Gln und GABA, trotz unveränderter endogener Metaboliten-Konzentrationen im Cortexgewebe. Dies bedeutet, dass die Gln-Glu-GABA-Flussraten zwischen Astrozyten und Neuronen in diesen Tieren schneller ablaufen, was zu einem erhöhten oxidativen Stoffwechsel, verbunden mit einer erhöhten GABAergen und glutamatergen Neurotransmission in *Mct8*-defizienten Mäusen führt. Die Flussraten wurden jedoch nicht mit Hilfe von mathematischen Modellen berechnet. Weder SDH-Mangel noch SDH-Überschuss im Gehirn zeigten einen eindeutigen Einfluss auf die Neurotransmitterzusammensetzung im Cortex *Mct8*-defizienter Mäuse. Hypothyreote Wildtyp-Mäuse zeigen nur erhöhte GABA-Konzentrationen, hyperthyreote dagegen nur erhöhte Glutamin-Konzentrationen. *Mct8/Dio2*-Doppelknockout Mäuse, welche hypothyreot im Gehirn sind, ähneln in ihrer Neurotransmitterzusammensetzung den *Mct8*-defizienten Mäusen, jedoch konnte bei diesen Tieren kein Glutamin detektiert werden. *Dio2*-defiziente Mäuse

zeigen wiederum neben erhöhten Gln-Konzentrationen normale Glu- und GABA-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass der komplexe Energiestoffwechsel bei *Mct8*-Defizienz von mehreren Faktoren reguliert wird und kein eindeutiges Muster hinsichtlich des Einflusses von SDH und deren Transport in Abhängigkeit von *Mct8* auf den Gehirnstoffwechsel zugeordnet werden konnte (Rodrigues et al. 2013a). Dass das *Mct8*-defiziente Gehirn nicht in einem globalen hypothyreoten Zustand ist, wurde bereits durch die Publikation meiner Arbeitsgruppe gezeigt (Wirth et al. 2009). Klar ist aber, dass *Mct8* eine wichtige Rolle im zerebralen Energiestoffwechsel einnimmt und die grundlegenden Mechanismen weiter untersucht werden müssen. Zur Klärung der genaueren Rolle von *Mct8* im zerebralen Energiestoffwechsel wurden männliche Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente Mäuse an der gleichen Einrichtung in Kooperation mit Prof. Juan Bernal und Prof. Sebastian Cerdan ^1H und ^{13}C NMR Analysen unterzogen. Alter der Tiere und Versuchsaufbau wurden zur Vergleichbarkeit beibehalten. Nach einer 30-minütigen Infusion von $[1-^{13}\text{C}]$ Glukose wird ein *steady-state* aller Metabolite im Gehirn erreicht. Augenmerk der Analyse lag hier neben dem Cortex auf dem Striatum, eine Gehirnregion die wichtig für Motorik und Verhalten und sensitiv gegenüber SDH-Verfügbarkeit ist (Martinez et al. 2001). In männlichen *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäusen deutet sich ein verringerter Umsatz von Laktat aus Glukose als Substrat an. Dieser wird im Striatum signifikant und spricht für einen glykolytisch hypometabolen Zustand in Neuron-spezifisch *Mct8*-defizienten Mäusen. Während Wildtyp-Mäuse einen Großteil der Glukose via Glykolyse-generiertem Pyruvat zu Laktat verstoffwechseln, zeigen *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäuse eine verringerte Glykolyse-Aktivität, gekennzeichnet durch einen verringerten ^{13}C -Einbau in Laktat sowie einer reduzierten Genexpression der Phosphofruktokinase (*Pfkm*). Bestätigt wird dies durch die Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität in Cortex und Striatum. Hier zeigte sich vor allem im Striatum von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen ein reduzierter Umsatz von Pyruvat zu Laktat unter Verbrauch von NADH zu NAD^+ . Basierend auf der Astrozyten-Neuron-Laktat Shuttle Hypothese führt dies zu einer geringeren Versorgung der Neurone mit Laktat. Da Glykolyse und folglich die Bildung von Laktat durch den Co-Transport von Natriumionen und Glutamat bzw. GABA in Astrozyten stimuliert wird (Pellerin et al. 1994; Pellerin et al. 1998), reflektiert der reduzierte Laktatbedarf von Neuronen eine geringere synaptische Aktivität bei neuronalem *Mct8*-Verlust. Untermauert wird diese Annahme durch Genexpressionsanalysen von Transportern und Enzymen für die Neurotransmitterbiosynthese und deren Metabolismus. Neben einer signifikanten Reduktion des *Pfkm*-Gentranskripts im Cortex von Neuron-spezifisch *Mct8*-defizienten Mäusen wird auch die Astrozyten-spezifische Glutaminsynthetase (*Gs*) geringer

exprimiert, das heißt es wird weniger Glu zu Gln im Astrozyten gebildet, was für eine Verzögerung des astrozytären Gln-Stoffwechsels im Cortex spricht. Dies erklärt womöglich auch die nicht detektierbaren Gln-Mengen nach ^{13}C NMR. Eine geringere Gln-Bildung steht zudem in Wechselwirkung mit einer geringeren Genexpression von Neuron- (*Slc38a2*) und vor allem Astrozyten-spezifischen (*Slc38a3*, *Slc38a5*) Glutamintransportern (Broer et al. 2001; Melone et al. 2006). Zusätzlich ist auch der GABA-Metabolismus durch eine erniedrigte Genexpression der Glutamatdehydrogenase *Gad1* und des astrozytären GABA-Transporters *Slc6a11* (Minelli et al. 1996) im Cortex von *CamK-Cre;Mct8^{fl/y}*-Mäusen beeinträchtigt. Trotz der veränderten Laktatmengen ist der ^{13}C -Einbau in die Neurotransmitter Glu und GABA sowohl am C4, als auch am C2 Atom in den Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen im Cortex und Striatum unverändert. Hier zeigten sich in der globalen *Mct8*-defizienten Maus erhöhte Gln-, Glu- und GABA-Konzentrationen (Rodrigues et al. 2013a). Somit hat der neuronale Verlust von *Mct8* keinen Einfluss auf die Flussraten der glutamatergen und GABAergen Neurotransmission. Die Detektion von Gln C4 konnte sowohl in WT, als auch in Neuron-spezifisch *Mct8*-defizienten Mäusen nicht erfolgen, da das Signal in fast allen untersuchten Tieren unter dem Detektionslimit lag. Ein Einbau an C2-Position in Glu und Gln konnte ebenfalls aufgrund der geringen chemischen Verschiebung nicht explizit bestimmt werden, weshalb diese Metabolite zu Glx C2 zusammengefasst ausgewertet wurden. Somit können auch hierüber keine Aussagen zum Gln-Gehalt getroffen werden. Im Voraus durchgeführte *ex vivo* ^1H NMR Studien dieser Tiere zeigten allerdings keine Änderungen der endogenen Glu-, Gln- und GABA-Konzentrationen in Cortex und Striatum. Messungen der Neurotransmitterkonzentrationen bezogen auf das Feuchtgewicht von Cortex und Striatum wären eine weitere hilfreiche Methode, um Aussagen über die endogene Glu-, Gln- und GABA-Konzentration zu treffen. Im Zuge der NMR-Analysen wurden auch zwei weibliche Neuron-spezifische *Mct8*-defiziente und Wildtyp-Mäuse analysiert. Diese zeigten bereits endogen stark verringerte Laktatkonzentrationen sowie nach ^{13}C NMR in Cortex und Striatum ohne detektierbare Änderungen in der Neurotransmitterzusammensetzung. Diese Ergebnisse stützen die beobachteten Änderungen des zerebralen Metabolismus in männlichen Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mäusen und einer Rolle von *Mct8* im zerebralen Energiestoffwechsel.

Zusammenfassend ergibt sich für den zerebralen Stoffwechsel bei neuronalem *Mct8*-Verlust folgendes Bild: Ein verlangsamter zerebraler Stoffwechsel in *Mct8*-defizienten Neuronen führt zu einem geringeren Bedarf an Laktat als Energiesubstrat. Dies wiederum führt dazu, dass der astrozytäre Stoffwechsel von Neurotransmittern weniger stimuliert wird sowie der

transzelluläre Transport von Gln und GABA zwischen Neuronen und Astrozyten reduziert ist, was sich zudem in einer Reduktion von Transportern und Enzymen für Gln und GABA widerspiegelt. Ein Zusammenhang zwischen einer reduzierten Expression von Neurotransmittertransportern und einer reduzierten synaptischen Aktivität konnte bereits für die Parkinson Krankheit beschrieben werden. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zur selektiven Degeneration von dopaminergen Neuronen in der substantia nigra und ihrer Nervenendigungen im Striatum (Fearnley et al. 1991). SPECT-Studien mit [123 I]- β -CIT, einem Kokainderivat, welches an den Dopamintransporter (DAT) bindet, zeigten, dass es über die Zeit und Schwere der Erkrankung bei Parkinson Patienten zu einer verringerten Bindung von Dopamin an DAT im präsynaptischen Neuron kommt, was mit einer reduzierten Expression dieses korreliert (Marek et al. 1996; Asenbaum et al. 1997).

Der neuronale Verlust von *Mct8* führt zu einem glykolytisch hypometabolen Zustand des murinen Gehirns. Dieser wird häufig in neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer, beobachtet (Mosconi et al. 2008). Die Alzheimer Krankheit ist eine altersabhängige Erkrankung, die sich erst im höheren Alter (ab 60 Jahren) aufgrund von Anzeichen einer Demenz und der Einschränkung kognitiver Fähigkeiten diagnostizieren lässt. Die in dieser Arbeit analysierten *CamK-Cre;Mct8^{gfl/fl}*-Mäuse waren sechs Monate alt. Dies entspricht einem menschlichen Alter von 30 - 40 Jahren. Immunhistochemische Antikörper-Färbungen wurden in noch jüngeren Tieren durchgeführt. Die Analysen von älteren Mäusen (> 1 Jahr) könnten möglicherweise erste strukturelle Veränderungen im Gehirn aufzeigen. Nicht zum ersten Mal würden *Mct8*-defiziente Mäuse erst im Alter morphologische Veränderungen aufzeigen. Meine Arbeitsgruppe untersuchte die Morphologie von Schilddrüsen in unterschiedlich alten globalen *Mct8*-defizienten Mäusen. Die Schilddrüsen dieser Tiere zeigten bereits ab sechs Monaten papilläre Schilddrüsenhyperplasien, welche sich mit zunehmenden Alter in papillären Schilddrüsenkarzinom manifestierten (Wirth et al. 2011).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass *Mct8* mit anderen Transportern der *Major Facilitator Superfamily* interagiert und so den Transport von Substraten, wie Glukose oder Laktat, reguliert. Homodimerisierungen für *Mct1* und *Mct8* wurden bereits beschrieben (Wilson et al. 2002; Biebermann et al. 2005). Mehrere Arbeitsgruppen wiesen zudem bereits nach, dass *Mct8* selbst kein Transporter aromatischer Aminosäuren (Phe, Trp, Tyr) ist (Friesema et al. 2003; Kinne et al. 2010; van der Deure et al. 2010). Interaktionen zwischen Rezeptoren und Transportern zur Erhöhung der Substrataufnahme wurden ebenfalls bereits gezeigt. Die Arbeitsgruppe um Lee *et al.* zeigte, dass eine Interaktion zwischen dem Dopamin D2-Rezeptor und dem Dopamintransporter wichtig für die Rekrutierung des Transporters an

der Zelloberfläche ist, wodurch eine erhöhte Dopaminaufnahme gewährleistet wird (Lee et al. 2007). Erste vielversprechende Versuche zu Interaktionsstudien mittels YFP-Proteinfragment Komplementationsassays (YFP-PCA) (Nyfeler et al. 2008) wurden in Kooperation mit Prof. Heike Biebermann (Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Charité Berlin) in HEK293-Zellen während dieser Arbeit durchgeführt. Es konnte eine Interaktion für Mct8 mit Mct1, Mct2 und Mct4 sowie die bereits beschriebene Homodimerisierung von Mct8 (Biebermann et al. 2005) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Heterodimerisierungen müssen jedoch zur Bestätigung wiederholt werden. Zudem muss untersucht werden, ob die Dimerisierung Einfluss auf die Laktat-Transportaktivität, Oberflächen- und Totalexpression in Gehirnzellen hat. Die Prüfung einer möglichen Interaktion von Mct8 mit Glukosetransportern (Glut1, Glut3) sollte aufgrund der erhobenen Daten ebenfalls analysiert werden.

Die *in vivo* Analysen der *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Maus zeigen, dass Mct8 eine entscheidende Funktion in der Interaktion zwischen Astrozyten und Neuronen hinsichtlich des transzellulären Gln-Glu-GABA Zyklus einnimmt. Vor allem sind Astrozyten-spezifisch exprimierte Transporter und Enzyme in ihrer Genexpression reduziert, wodurch es vermutlich zu einer gestörten Signalvermittlung vom Neuron zum Astrozyten aufgrund des spezifischen neuronalen *Mct8*-Verlustes kommt. Diese Vermutung zeigte sich bereits bei der Analyse kortikal exprimierter SDH-regulierter Gene (siehe 4.2) und bestärkt die Hypothese, dass Astrozyten wichtige Versorgungszellen und Signalvermittler von Neuronen sind. Die spatio-temporale SDH-Verfügbarkeit scheint dagegen keine wichtige Rolle in diesem Kontext einzunehmen, wie zum einen die Gruppe um Prof. Juan Bernal zeigen konnte (Rodrigues et al. 2013a). Zum anderen konnten die in drei Monate alten Mäusen gering veränderten totalen SDH-Serumparameter nicht mehr in sechs Monate alten *CamK-Cre;Mct8^{fl/fl}*-Mäuse bestätigt werden.

4.4 Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf den Energiestoffwechsel *Mct8*-defizienter Gehirnzellen *in vitro*

Neben *in vivo* Studien zum Energiestoffwechsel in *Mct8*-Defizienz wurde dieser ebenfalls *in vitro* in von *Mct8*-defizienten Mäusen generierten Astrozyten- und Neuronkulturen untersucht. Hierfür wurde der *Seahorse XF^e Flux Analyzer* genutzt. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die beiden Energiestoffwechselwege Glykolyse und mitochondriale Atmung in intakten Zellen simultan zu messen. Die Entwicklung eines definierten Serum-freien Mediums in unserer Arbeitsgruppe (Wirth et al. 2009; Roth et al. 2010b) für beide Kulturen ermöglichte zudem den

Einfluss von SDH auf den Energiestoffwechsel von Wildtyp- und *Mct8*-defizienten Gehirnzellen zu untersuchen.

Bereits 1895 zeigte Magnus-Levy, dass eine exogene T4-Gabe zu einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs und der CO₂-Produktion in hypo- und euthyreoten Organismen führt (Magnus-Levy 1895). Diese Ergebnisse wurden in den 1980er Jahren durch verschiedene Arbeitsgruppen anhand isolierter Mitochondrien aus Rattenlebern bestätigt (Brand et al. 1987; Hoch 1988). Ein direkter Einfluss von SDH auf die mitochondriale Funktion konnte durch die T3-Regulation von nukleär- und mitochondrial-kodierten Genen, wie der 12S und 16S RNA, Untereinheit der Cytochrom C Oxidase (Vega-Nunez et al. 1995; Koibuchi et al. 1996) und der NADH Dehydrogenase Untereinheit 3 (Iglesias et al. 1995) nachgewiesen werden. Zudem wurde die funktionale Existenz mitochondrialer SDH-Rezeptoren in der Rattenleber und im Muskel der Maus bereits in den 1990er Jahren durch unterschiedliche Arbeitsgruppen gezeigt. Sie identifizierten zwei trunkierte Formen des TR α 1-Rezeptors (p28 und p43), denen das Kernlokalisierungssignal fehlt und die als T3-abhängige Transkriptionsfaktoren des mitochondrialen Genoms fungieren (Wrutniak et al. 1995; Casas et al. 1999). Zudem konnte die Expression von p43 im Cerebellum junger Ratten (P8) nachgewiesen werden, welches fähig ist, das SDH-responsive Element (DR2) in der D-Loopregion mitochondrialer DNA zu binden und so die Expression mitochondrialer Gene zu regulieren (Sinha et al. 2010). Somit kommt es zu einer Koordination des mitochondrialen Genoms und nukleärer Gene, welche für mitochondriale Gene kodieren, die essentiell für den Energiestoffwechsel sind und zum Teil durch SDH reguliert werden.

4.4.1 Energiestoffwechsel *Mct8*-defizienter Astrozyten

Die in dieser Arbeit angewandte Isolationsmethode von primären Astrozyten aus murinem zerebralen Cortexgewebe wird durch unsere Arbeitsgruppe schon lange Zeit erfolgreich genutzt und führt zu einer Reinheit der Primärkulturen von > 95% (Braun et al. 2011a). Durch die Analyse Astrozyten-spezifischer Markerproteine (Gfap, Glial, Glut1) konnte dies sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Zudem zeigten radioaktive SDH-Aufnahmeexperimente, dass WT Astrozyten über einen Zeitverlauf von 30 Minuten T3 aufnehmen (wobei der Anstieg in den ersten drei Minuten linear verlief). *Mct8*-defiziente Astrozyten dagegen zeigten eine um mehr als die Hälfte reduzierte T3-Aufnahme, welche auch mit einem in unserem Institut entwickelten nicht-radioaktiven Assay bestätigt werden konnte (Jayarama-Naidu et al. 2015). Dr. Doreen Braun aus dem Institut hat zudem gezeigt, dass *Mct8*

neben der T4-Aufnahme in primäre Astrozyten der Maus ebenfalls an der Abgabe von T3 und T4 beteiligt ist (unpublizierte Daten).

Zur Überprüfung der physiologischen Wirksamkeit des Serum-freien Kulturmediums wurde vor Beginn der Seahorse-Experimente ein Vergleich zwischen Astrozyten-Kulturmedium (DMEM + 10% FBS) und dem definierten Medium durchgeführt. Hierbei zeigten sich keine Änderungen in der basalen und maximalen Atmungsrate sowie ATP Umsatz und Reservekapazität in WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten. Somit konnten mögliche Änderungen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) durch die Verwendung und Zusammensetzung des definierten Mediums ausgeschlossen werden.

Insgesamt zeigen WT Astrozyten nach einer Kultivierungsdauer von fünf Tagen mit 3nM und 10nM T3 bzw. T4 und auch ohne die Zugabe von SDH über alle berechneten Parameter (basale und maximale Atmung, ATP Umsatz, Reservekapazität, Protonenleck) eine stabile OXPHOS. Lediglich *Mct8*-defiziente Astrozyten erhöhen ihre basale Atmung bei Kultivierung mit 3nM T3 ($p=0,06$) und T4 ($p=0,09$) im Vergleich zu WT Astrozyten. Dieser Anstieg geht mit einem erhöhten ATP Umsatz einher, da dieser die basale Atmung kontrolliert. Die Kultivierung mit 10nM T3 bzw. T4 führte jedoch zu keiner weiteren Steigerung der Zellatmung. Das Protonenleck beschreibt den Verlust von Energie in Form von Wärme. Hierbei wird durch das Entkoppeln von oxidativer Phosphorylierung und ATP-Synthese der für die Energiegewinnung nötige Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran unterbrochen und es kommt stattdessen zur Wärmeproduktion (Cheng et al. 2010). Das Protonenleck nimmt somit ebenfalls Einfluss auf die basale Atmung, jedoch nicht auf den ATP Umsatz. Das Protonenleck zeigt einen ähnlichen SDH-konzentrationsabhängigen Verlauf in *Mct8*-defizienten Astrozyten, wie die basale Atmung, wobei WT Zellen bei einer Langzeitinkubation mit 10nM T3 einen Anstieg aufzeigen ($p=0,06$). Bereits seit den 1990er Jahren ist bekannt, dass SDH die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran beeinflussen, was zu einem erhöhten Einstrom in die Mitochondrienmatrix von Protonen führt (Brand et al. 1992). Ein erhöhtes Protonenleck kann ebenfalls auf die Expression von Entkoppler-Proteinen (engl. *uncoupling proteins*, UCPs) zurückgeführt werden. Diese sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und konnten als T3-regulierte Gene identifiziert werden (Lanni et al. 2003). Genexpressionanalysen von *Ucp2* zeigten jedoch keine Änderungen zwischen WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten sowie über die verschiedenen Behandlungen (Daten nicht gezeigt). ATP Umsatz und Reservekapazität sind zwischen WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten unverändert. Dies bedeutet, dass primäre Astrozyten beider Genotypen unter den gegebenen SDH-Kulturbedingungen und in Anwesenheit von Glukose und Glutamin als Energieäquivalente

keine Einschränkungen in der Elektronentransportaktivität und Substratoxidation aufweisen. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass SDH in An- und Abwesenheit von *Mct8* die Plasmamembran passieren und auch in den Mitochondrien, als Ort der Energiesynthese in Form von ATP, ihre Wirkung ausüben können. Zum anderen zeigen die Daten, dass sowohl WT, als auch *Mct8*-defiziente Astrozyten über variierende physiologische SDH-Konzentrationen in ihrem Energiestoffwechsel stabil sind und keine mitochondrialen Dysfunktionen aufweisen (gemessen als Zellrespirationskontrolle, cRCR). Studien zur Analyse der Transporterexpression zeigten, dass in *Mct8*-defizienten Astrozyten weitere T3- und T4-Transporter exprimiert werden (Lat1 und Lat2), die möglicherweise für den Verlust von *Mct8* kompensieren. Lat2 wurde bereits durch unsere und andere Arbeitsgruppen als potentieller alternativer SDH-Transporter in den frühen Entwicklungsphasen bei *Mct8*-Defizienz diskutiert (Wirth et al. 2009; Braun et al. 2011a; Nunez et al. 2014). Aufgrund der tendenziell erhöhten Atmungsraten in *Mct8*-defizienten Astrozyten, besonders bei Langzeitkultivierung mit 3nM T3 und T4, wurde die Citratsynthase-Aktivität bestimmt, welche als Biomarker für eine erhöhte Mitochondrienanzahl genutzt werden kann (Larsen et al. 2012). Anhand von *in silico* Screeningdaten wurde ein SDH-responsives Element (TRE) im Promotorbereich der Citratsynthase identifiziert, wodurch dieses somit ein potentiell T3-reguliertes Gen darstellt (Dorsa et al. 2010). Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten sowie über die Langzeitinkubation mit verschiedenen T3- und T4-Konzentrationen und somit sind die erhöhten Atmungsraten in *Mct8*-defizienten Astrozyten nicht auf eine erhöhte Mitochondrienmasse zurückzuführen. Eine erhöhte Atmungsrate in *Mct8*-defizienten Astrozyten kann auch auf eine erhöhte Expression der einzelnen Komplexe der Atmungskette zurückgeführt werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression wichtiger OXPHOS Komplexuntereinheiten sowie des mitochondrialen Transkriptionsfaktors *Tfam* (T3-reguliertes Gen) auf Transkript- und Proteinebene nach T3- und T4-Langzeitkultivierung bzw. ohne SDH untersucht. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten detektiert werden. Eine Signalminderung ist lediglich für die mitochondrial-kodierte Untereinheit der Cytochrom C Oxidase (mt-Co1) auf Proteinebene zu verzeichnen. Dieser IV. Komplex innerhalb der Atmungskette ist für die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser, unter Verbrauch von vier Elektronen aus Cytochrom C und Protonen, verantwortlich, wodurch der Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut wird, welcher von der ATP-Synthase zur ATP-Synthese benötigt wird. Würde in *Mct8*-defizienten Astrozyten tatsächlich eine Verringerung dieses Komplexes vorliegen, müsste man unter einer Behandlung mit 10nM T3 auch eine

Reduktion der basalen und maximalen Atmungsrate sowie dem ATP Umsatz in *Mct8*-defizienten Astrozyten erhalten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Hier zeigt sich eine metabolische Flexibilität in Astrozyten, das heißt, trotz weniger mt-Co1-Protein wird eine ausreichende Funktionalität des Komplexes erhalten.

Astrozyten bzw. Gliazellen im Allgemeinen sind, aufgrund der *Dio2*-spezifischen Expression, wichtige Regulatoren der SDH-Homöostase im Gehirn und zudem Versorgungszellen der Neurone mit T3 (Morte et al. 2014). Anhand dieser Funktionen und den in dieser Arbeit erhobenen Daten bezüglich des Energiestoffwechsels lässt sich vermuten, dass Astrozyten größere Veränderungen hinsichtlich des SDH-Metabolismus regulieren können, um die neuronale Aktivität bis zu einem gewissen Grad aufrechtzuerhalten. Es konnten auch keine transkriptionellen Änderungen der *Dio2* über die Behandlungen beobachtet werden. Vermutlich sind die eingesetzten Mengen an SDH zu gering, um zum einen die *Dio2* durch geringe T3-Konzentrationen zu induzieren, was im konstitutiven *Mct8*-defizienten Mausmodell beobachtet wird (Trajkovic et al. 2007) bzw. zum anderen durch zu hohe T4-Konzentrationen zu inhibieren (Arrojo et al. 2013). Außerdem ist die SDH-Verfügbarkeit im Organismus durch die Expression und Aktivität der Dejodasen stark zeitlich und örtlich reguliert. Primäre Zellen in Kultur unterliegen nicht mehr dieser Regulation, wie sie im Gehirn vorzufinden ist, was somit zu unterschiedlichen Daten zwischen *in vivo* und *in vitro* Versuchen führt. Viele Arbeitsgruppen postulierten morphologische Änderungen der Astrozyten durch die Zugabe von T3 *in vitro*. Dabei zeigten die Zellen, nach Kultivierung mit 50nM T3, eine Veränderung von flachen polygonalen Zellen zu Fortsatz-ausbildenden Zellen, charakterisiert durch eine Reorganisation des Zytoskeletts (GFAP) und der extrazellulären Matrix (Fibronektin) (Aizenman et al. 1987; Trentin et al. 1995). Während dieser Arbeit konnten sowohl nach Passagieren der Zellen, als auch durch die verschiedenen physiologischen SDH-Konzentrationsbehandlungen (3nM und 10nM T3/T4 in Anwesenheit von BSA) keine morphologischen Veränderungen beobachtet werden.

4.4.2 Energiestoffwechsel *Mct8*-defizienter Neurone

Parallel zu den primären Astrozytenkulturen wurde eine Isolierungsmethode primärer Neurone in unserem Institut entwickelt. Für die Kultivierung von Neuronen ist das kommerziell erhältliche B27-Mediensupplement verfügbar, welches die Gliazellproliferation unterdrückt (Roth et al. 2010b). Nachteil ist, dass die Firma keine Konzentrationsangaben aller enthaltenden Reagenzien gibt. Die Etablierung eines Serum-freien definierten Mediums für primäre Neuronkulturen ermöglicht somit die Variation aller Komponenten, um den Einfluss zum

Beispiel von Antioxidantien oder SDH in solchen Kulturen zu untersuchen (Wirth et al. 2009; Roth et al. 2010b). Eine Charakterisierung von *Mct8*-defizienten Neuronen hinsichtlich ihrer Transporterexpression erfolgte bereits 2009 durch unsere Arbeitsgruppe. Wirth *et al.* konnten zeigen, dass 75% der T3-Aufnahme in Neurone *Mct8*-abhängig abläuft. Aufgrund der 25%igen Restaufnahme von T3 in *Mct8*-defiziente Neurone untersuchten sie den Einfluss anderer potentieller SDH-Transporter durch die Zugabe verschiedener Inhibitoren der einzelnen Transporterfamilien (BSP, Mct-spezifisch; BCH, Lat-spezifisch; Probenecid, Oatp-spezifisch). Die Kombination aller drei Inhibitoren führte zu einer Reduktion der T3-Aufnahme um 50% in WT Neuronen. In *Mct8*-defizienten Neuronen dagegen erzielte die Doppelkombination von BCH und Probenecid und die Dreifachkombination eine nochmalige Reduktion der T3-Aufnahme, was somit für eine Beteiligung von SDH-Transportern der Lat- und Oatp-Familie an der T3-Aufnahme in *Mct8*-defiziente Neurone spricht (Wirth et al. 2009). Der Expressionsnachweis von Lat2 in Neuronen und dem Mausgehirn erfolgte ebenfalls im Zuge dieser Publikation und bekräftigt somit die Hypothese eines alternativen T3-sensitiven Transporters (Wirth et al. 2009). Zudem konnte die Expression von *Lat1*, *Lat2* und *Mct10* auch nochmal im Zuge dieser Arbeit auf Transkriptebene bestätigt werden.

Um einen möglichen Einfluss des definierten Kulturmediums auf den Energiestoffwechsel im Vergleich zum B27-Mediumszusatz zu untersuchen, wurden WT Neurone über sieben Tage entsprechend in beiden Mediensupplementen kultiviert und ihre mitochondriale Atmung im *Seahorse XF^e Flux Analyzer* gemessen. Es zeigten sich keine Änderungen hinsichtlich basaler und maximaler Atmung sowie ATP Umsatz und Reservekapazität. Somit können auch in Neuronkulturen mögliche Änderungen dieser Parameter spezifisch auf den Zellgenotyp zurückgeführt und der Einfluss von SDH auf den Energiestoffwechsel untersucht werden.

Bereits im Ruhezustand (basale Atmung) zeigen *Mct8*-defiziente Neurone einen geringeren Sauerstoffverbrauch. WT und auch zu geringerem Anteil *Mct8*-defiziente Neurone steigern durch die Zugabe von 3nM und 10nM T3 bzw. T4 den Sauerstoffverbrauch konzentrationsabhängig. Trotz der geringeren basalen Atmung steigern *Mct8*-defiziente Neurone ihren ATP Umsatz signifikant nach Langzeitkultivierung mit 3nM T3, d.h. sie sind effizienter in Bezug auf die ATP-Bildung. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine erhöhte Expression OXPHOS-relevanter Gene, die jedoch sowohl auf Transkript-, als auch Proteinebene nicht bestätigt werden konnte. Hier zeigen sich eher verringerte Expressionen wichtiger Proteinuntereinheiten der Komplexe III (Uqcrc2) und IV (mt-Co1) in *Mct8*-defizienten Neuronen. Des Weiteren könnte eine erhöhte Mitochondrienmasse die gesteigerte

ATP-Bildung erklären. Messungen der Citratsynthase-Aktivität zeigten jedoch keine Änderungen zwischen WT und *Mct8*-defizienten Neuronen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen zudem, dass T4, als Prohormon für das bioaktive SDH T3, ebenfalls eine intrinsische Aktivität aufweist. Die Langzeitkultivierung mit 3nM T4 führt zu geringeren Unterschieden aller berechneten OXPHOS-Parameter zwischen WT und *Mct8*-defizienten Neuronen. Während die Kultivierung mit T3 eher einen geringeren Einfluss zeigt, führt die Inkubation mit T4 zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Reservekapazität in *Mct8*-defizienten Neuronen. Diese Funktion beschreibt, wie nah Zellen am bioenergetischen Limit unter den gegebenen Kulturbedingungen arbeiten und somit sprechen die Ergebnisse für eine physiologische Aktivität von T4 am Energiestoffwechsel. Durch den Verlust von *Mct8*, welcher eine leicht höhere Affinität für T3 (K_m -Wert = $4,0\mu\text{M}$), als T4 (K_m -Wert = $4,7\mu\text{M}$) besitzt (Friesema et al. 2003), kommt es in diesen Neuronen zu einer verringerten T3-Aufnahme in die Zellen (Wirth et al. 2009). Dies resultiert in einer reduzierten Sauerstoffverbrauchsrate (OCR). Das *Mct8*-defiziente Neurone eine beeinträchtigte SDH-Aufnahme besitzen, zeigten die in dieser Arbeit erhobenen Genexpressionsdaten der *Dejodase* 3. WT Neurone erhöhen die Expression der *Dio3* in einem konzentrationsabhängigen Verlauf, *Mct8*-defiziente Neurone reagieren dagegen nur sehr schwach auf die T3- und T4-Konzentrationen. Die Beteiligung anderer T4-sensitiver Transporter, wie zum Beispiel Mitglieder der L-Typ Aminosäuren Transporterfamilie (Lat), erklärt möglicherweise die beobachteten Effekte. Die SDH-abhängige Induktion der Sauerstoffverbrauchsrate wurde pharmakologisch in WT Neuronen durch die Zugabe des Lat-spezifischen Inhibitors BCH untersucht. Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit 10nM T3 zum Anstieg der basalen und maximalen Atmung führt, welche durch die Zugabe von BCH blockiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Somit sind eindeutig Mitglieder der Lat-Familie an der SDH-Aufnahme in primäre Neurone beteiligt, was bereits 2009 durch Wirth *et al.* nachgewiesen wurde (Wirth et al. 2009), jedoch zeigten Kinne *et al.*, dass dieser Transporter nicht in der Lage ist T4 zu transportieren (Kinne et al. 2015). Ein weiterer Kandidat, der in Neuronen exprimiert ist und T4 transportiert, ist Lat1 (Zevenbergen et al. 2015). Neben der T4-Aufnahme in *Mct8*-defiziente Neurone durch andere SDH-sensitive Transporter gibt es noch die Erklärung eines direkten T4-vermittelten Effekts am SDH-Rezeptor. Anhand von Studien der *Dio2*-defizienten Maus schlussfolgerte die Gruppe um Galton, dass T4 direkt transkriptionelle Aktivitäten am SDH-Rezeptor ausübt, um die neurologischen Schädigungen durch stark reduzierte T3-Konzentrationen im Gehirn zu mildern (Galton et al. 2007). Jahre zuvor zeigte die Gruppe bereits, dass die Inkubation mit physiologischen Konzentrationen von T3 und T4 in Kulturen

roter Blutzellen aus der Kaulquappe, welche keine *Dio1* und *Dio2* exprimieren, zu einem Anstieg der SDH-Rezeptoren führte (Schneider et al. 1995). *Mct8*-defiziente Neurone zeigen verringerte Atmungsraten bei allen analysierten Parametern der mitochondrialen Atmung, die mit einer teilweisen transkriptionellen und translationalen (Komplex III und IV) Reduktion spezifischer Untereinheiten der einzelnen Komplexe der Atmungsrate einhergehen. Trotzdem zeigen diese Neurone keine Reduktion der mitochondrialen Masse, gemessen als Citratsynthase-Aktivität, oder der OXPHOS-Kapazität im allgemeinen (cRCR). Somit sind diese Effekte eindeutig einer *Mct8*-abhängigen SDH-vermittelten Aktivität zuzuordnen. In der Literatur wurde bisher eine direkte Regulation der Cytochrom C Oxidase UE durch T3 und den Metaboliten 3,5-T2 beschrieben (Koibuchi et al. 1996; Arnold et al. 1998).

Zusammenfassend ergibt sich für den Energiestoffwechsel *Mct8*-defizienter Neurone *in vitro* folgendes Bild: aufgrund des *Mct8*-Verlustes in Neuronen kommt es zu einer verringerten Aufnahme von SDH in die Zellen, was in einer verringerten Expression von OXPHOS-relevanten Genen/Proteinen (teilweise SDH-reguliert) sowie in einer verringerten Sauerstoffverbrauchsrate (gemessen als OCR) resultiert. Somit stützen die *in vitro* Daten die erhobenen *in vivo* Daten des Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mausmodell bezüglich einer reduzierten synaptischen Aktivität sowie eines verlangsamten Stoffwechsels. Des Weiteren zeigen die Daten, dass der *Mct8*-Verlust den Energiestoffwechsel von Neuronen stärker beeinflusst, als den von Astrozyten.

Die in dieser Arbeit erhobenen *in vitro* Daten wurden in primären Einzelkulturen von WT und *Mct8*-defizienten Astrozyten und Neuronen erhoben. Es ist bekannt, dass die zerebrale SDH-Verfügbarkeit einer strengen orts- und zeitspezifischen Regulation unterliegt (Chatonnet et al. 2015), die in Zellkulturmodellen jedoch nicht vorliegt. Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse des Neuron-spezifischen *Mct8*-defizienten Mausmodells zeigte eine wichtige Beteiligung von Astrozyten und deren Interaktion mit Neuronen im zerebralen Energiestoffwechsel. In diesem Zusammenhang wäre die Analyse eines Ko-Kulturmodells im *Seahorse XF^e Flux Analyzer* von *Mct8*-defizienten Astrozyten und Neuronen ein wichtiger *in vitro* Ansatz, um die Effekte der Einzelkulturen in den Zusammenhang des komplexen Gehirns bringen zu können. Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben bereits, dass Astrozyten Wachstumsfaktoren (bFGF, EGF) sekretieren, die wichtig für die neuronale Migration und Differenzierung sind (Trentin et al. 2003; Martinez et al. 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen außerdem, dass die postulierten Daten hinsichtlich eines Einflusses von SDH auf die basale Atmung und die ATP Produktion differenzierter betrachtet werden müssen. Eine Verallgemeinerung für alle Gewebe sollte nicht gezogen werden. Ein

wichtiger Aspekt ist dabei die Expression der SDH-Transporter und SDH-Rezeptoren in einer Gewebe- und/oder zeitlichen Weise. Zudem wurden viele Studien mit pharmakologischen SDH-Konzentrationen und dem Einsatz eines Hormon-reduzierten fetalen Kälberserums im Medium durchgeführt. Die Methode des sog. *Charcoal-Strippen* entfernt nicht nur SDH und Steroide, sondern reduziert ebenfalls die Serumkonzentrationen an Folat, Vitamin B12, Magnesium, Kalium und Phosphat (Cao et al. 2009). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden mit physiologischen T3- und T4-Konzentrationen und durch die Zugabe von BSA, als SDH-Bindeprotein, durchgeführt. Trotzdem die freien SDH-Konzentrationen nicht gemessen werden konnten, ergibt sich bei den hier verwendeten Konzentrationen, beim Vergleich mit der Literatur, eine freie SDH-Konzentration im picomolaren Bereich, die der physiologischen Konzentration entspricht (Schmohl et al. 2015).

5 ANHANG

Tabelle 22: Übersicht aller verwendeten Primer für qPCR-Analysen mit Angabe der Primersequenz.

Primer	Primersequenz (5' → 3')	Primer	Primersequenz (5' → 3')
18S_fwd	TTGACGGAAGGGCACCACCAG	Itgb3_fwd	AGGATTGCCCTTCGACTACG
18S_rev	GCACCACCACCCACGGAATCG	Itgb3_rev	AGCCAATCCGAAGGTTGCTA
Ant_fwd	TGCAGTCTGGACGCAAAGGA	Ldha_fwd	GACTTGGCGGATGAGCTTGC
Ant_rev	GGACCATGCGCCCTTGAAAA	Ldha_rev	TGACCAGCTTGGAGTTCGCA
Atp5a1_fwd	CCTGGAATTATCCCCCGAAT	Ldhb_fwd	AGATGGTGGTGGACAGTGCC
Atp5a1_rev	CACAGTGGACCGCTTCTGAC	Ldhb_rev	CGAGCATTGAGGATGCACGG
Dio1_fwd	CACAGCCGATTTTCCTCATCA	Mbp_fwd	ACAGAGACACGGGCATCCTT
Dio1_rev	GCTGCTCTGGTTCTGCATTG	Mbp_rev	TCCTTGTACATGTGGCACAGC
Dio2_fwd	CTCCAAC TGCCTCTTCCTGG	Mct1_fwd	TCAGTGCAACGACCAGTGAA
Dio2_rev	GACGTGCACCACACTGGAAT	Mct1_rev	TGAAAGCAAGCCCAAGACCT
Dio3_fwd	CTACATCGAGGAAGCCCACC	Mct2_fwd	CGCTTGGATATCGTCCATCA
Dio3_rev	TGACGTAGAGGCGCTCAAAA	Mct2_rev	AGGCTGGTTGCAGGTTGAAT
Gad1_fwd	TGCCCAAAC TGGTCCTCTTC	mt-Col_fwd	GCCTTTCAGGAATAACCACGA
Gad1_rev	CGCAATTTCTCTGGATTGGAT	mt-Col_rev	AGGTTGGTTCCTCGAATGTG
Gad2_fwd	CTCTGCGGATCCTGAGAACC	Ndufb8_fwd	GTTGCCGGGGTCATATCCTA
Gad2_rev	GCAGTTGCAGGGTTTTTGGT	Ndufb8_rev	ACGGATCCCTCTCATGCTGT
Gdh1_fwd	TGGTCGATGTACCGTTTGGA	NeuN_fwd	CTGGGAACCCATATGCCAAT
Gdh1_rev	TGTCAGCGATCCAGGACATC	NeuN_rev	CAGTGCCGCTCCATAAGTTG
Gfap_fwd	ACCAGCTTACGGCCAACAGT	Nrf1_fwd	TCCCCCGAGGACACTTCTTA
Gfap_rev	TCCTCCAGCGATTCAACCTT	Nrf1_rev	CTCGCGTCGTGTACTCATCC
Gls_fwd	GGATTGCGAACATCTGATCC	Pc_fwd	AAGCCAAGGCACATTGAGGT
Gls_rev	AATCAGCAACCTTCCCTCCA	Pc_rev	CGGCGTTCTCATAGCCTACC
Gls2_fwd	AGGGAAGGAGGAGAGGTTTCG	Pfkm_fwd	GGTGACCAAAGACGTGACCA
Gls2_rev	TTGCAAGCCTCGATCAGAAA	Pfkm_rev	AGGCCAATCCTCACGGTAGA

Tabelle 22: Übersicht aller verwendeten Primer für qPCR-Analysen mit Angabe der Primersequenz.

Primer	Primersequenz (5' → 3')	Primer	Primersequenz (5' → 3')
Gs_fwd	ACATGGTGAGCAACCAGCAC	Slc6a11_fwd	TCGAGGCACACCTCAATGTC
Gs_rev	CGCATTTGTCCCCGTAATCT	Slc6a11_rev	GTGCTCAATGCCATCGGATA
Hr_fwd	GCTAGCAGGGTGCAGAACCT	Slc6a13_fwd	TTGGCCAGTACACCAACCAG
Hr_rev	CAGGTGTCCACGGTGTGAGT	Slc6a13_rev	GGTCAGTGGTGAAGCTGCTG
Itgav_fwd	ATCTTGGCCTGTGCTCCATT	Pvalb_fwd	AGATGGTGGGCCTGAAGAAA
Itgav_rev	AGCTACCAGGACCACCGAGA	Pvalb_rev	TCAGCCACCAGAGTGGAGAA
Slc16a10_fwd	GCCCCATCGTGAGTGTCTTC	Rc3_fwd	AGAGAGGCTGGTTCTGCAAG
Slc16a10_rev	GACCAGTGACGGCTGGTAGG	Rc3_rev	AATATCGTCGTCTGGCTTGG
Slc16a2_fwd	CCTCGCTATGGGCATGATCT	Sdhb_fwd	TTTACCGATGGGACCCAGAC
Slc16a2_rev	TGGTTGAAAGGCCAATGAGC	Sdhb_rev	CGTGTGCACGCCAGAGTATT
Slc1a1_fwd	TGGTCTGCGCGCTGTAGTAT	Slc7a5_fwd	GGCCATCATCATCTCCTTGC
Slc1a1_rev	CCACAGGCTTCACCTCTTCC	Slc7a5_rev	ACCCATTGACAGAGCCGAAG
Slc1a2_fwd	CGACAAGCTGGGGAAAAATC	Slc7a8_fwd	GCCACCCGGGTTCAAGATA
Slc1a2_rev	TTAGCATCCAGGCCTGACAA	Slc7a8_rev	ATAGGCAAAGGAGCCCTGGA
Slc1a3_fwd	ACTGCAGCAGATGCCTTCCT	Slc1c1_fwd	AGTGTGGCCGGACTGACTGT
Slc1a3_rev	GCATTGACCCCATTCACAGA	Slc1c1_rev	ACTCCGGCTGGAGGATTGAC
Slc1a6_fwd	TGCAGATGCTGGTGTACCC	Tfam_fwd	GTCGCATCCCCTCGTCTATC
Slc1a6_rev	CCAGGTCCATGAAAGCATCA	Tfam_rev	CTGGTAGCTCCCTCCACAGG
Slc2a1_fwd	CTGGCGGGAGACGCATAGTT	Thra_fwd	AAACGCAAGCTGATTGAGCA
Slc2a1_rev	CTCCGTAGCGGTGGTTCCAT	Thra_rev	CCGGCATGGAGACAATAGGT
Slc2a3_fwd	CTGACTGCCCTCTGGTCCTT	Thrb_fwd	AGTGCCAGGAATGTGCTTT
Slc2a3_rev	GCCACAGAAAATGCCAATGA	Thrb_rev	GGCTTGTGCCCAATTGATTT
Slc38a1_fwd	GTGATCTTCGGAGCCACCTC	Trh_fwd	CCAGAACGTCGATTCTTGAGG
Slc38a1_rev	ACCATCACCACCAACACTCG	Trh_rev	TCTCCAGGCTCCCACTTCTC
Slc38a2_fwd	CATGCAGAACATTGGGGCTA	Tshβ_fwd	GGGTATTGTATGACACGGGATA
Slc38a2_rev	GCAAATCACCACGATCAGGA	Tshβ_rev	ATTTCCACCGTTCTGTAGATGA
Slc38a3_fwd	CCTAGCACTGATGCGACAGC	Ucp2_fwd	GCCTCTACAATGGGCTGGTC
Slc38a3_rev	CACCACCATGTGGCTGAAGT	Ucp2_rev	GGAAGCGGACCTTTACCACA

Tabelle 22: Übersicht aller verwendeten Primer für qPCR-Analysen mit Angabe der Primersequenz.

Primer	Primersequenz (5' → 3')	Primer	Primersequenz (5' → 3')
Slc38a5_fwd	ACAAGCAGCCTCTCCCTGAC	Uqcrc2_fwd	TGCAACAAGGGAAAACATGG
Slc38a5_rev	GTGGCAGACAAACGCAAAAG	Uqcrc2_rev	GCCAAGGCATTCTTGTAGGC
Slc6a1_fwd	CAGCTGTGCTGTCCTTCTGG	Vglut2_fwd	ACCTACCCAGCCTGTCATGG
Slc6a1_rev	GGATCTGTCCTGGCTTGTCC	Vglut2_rev	ATGCTTTGCAGGGCTCTCAT
Vglut1_fwd	TCTTTGGCTTTGCCATTGTG	Vglut3_fwd	CGGTGGCTTCATTTCAAACA
Vglut1_rev	TAGGAACCGCAAAAGGCTGT	Vglut3_rev	CGTGGCTAGACGGCTTCTCT

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aizenman, Y. and J. de Vellis (1987). "Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation." *Brain Res* 414(2): 301-308.
- Alkemade, A., E. C. Friesema, A. Kalsbeek, D. F. Swaab, T. J. Visser and E. Fliers (2011). "Expression of thyroid hormone transporters in the human hypothalamus." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96(6): E967-971.
- Allan, W., C. N. Herndon and F. C. Dudley (1944). "Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microcephaly." *Am J Ment Defic* 48: 325-334.
- Anderson, C. M. and R. A. Swanson (2000). "Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions." *Glia* 32(1): 1-14.
- Arnold, S., F. Goglia and B. Kadenbach (1998). "3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP." *Eur J Biochem* 252(2): 325-330.
- Arrojo, E. D. R., T. L. Fonseca, J. P. Werneck-de-Castro and A. C. Bianco (2013). "Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling." *Biochim Biophys Acta* 1830(7): 3956-3964.
- Asenbaum, S., T. Brucke, W. Pirker, I. Podreka, P. Angelberger, S. Wenger, C. Wober, C. Muller and L. Deecke (1997). "Imaging of dopamine transporters with iodine-123-beta-CIT and SPECT in Parkinson's disease." *J Nucl Med* 38(1): 1-6.
- Auso, E., R. Lavado-Autric, E. Cuevas, F. E. Del Rey, G. Morreale De Escobar and P. Berbel (2004). "A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico-genesis alters neuronal migration." *Endocrinology* 145(9): 4037-4047.
- Barres, B. A. (1991). "New roles for glia." *J Neurosci* 11(12): 3685-3694.
- Barres, B. A., M. A. Lazar and M. C. Raff (1994). "A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development." *Development* 120(5): 1097-1108.
- Barros, L. F. (2013). "Metabolic signaling by lactate in the brain." *Trends Neurosci* 36(7): 396-404.
- Beraud, T., J. Cruchaud and A. Vannotti (1958). "[Effects of specific protein support of thyroxin on its cellular penetration.]." *Schweiz Med Wochenschr* 88(5): 105-107.
- Berbel, P., P. Marco, J. R. Cerezo and J. DeFelipe (1996). "Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the neocortex of hypothyroid adult rats." *Neurosci Lett* 204(1-2): 65-68.
- Bernal, J. (2000). *Thyroid Hormones in Brain Development and Function*. Endotext. L. J. De Groot, P. Beck-Peccoz, G. Chrousos et al. South Dartmouth (MA).
- Bernal, J. (2007). "Thyroid hormone receptors in brain development and function." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3(3): 249-259.
- Biebermann, H., P. Ambrugger, P. Tarnow, A. von Moers, U. Schweizer and A. Grueters (2005). "Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8." *Eur J Endocrinol* 153(3): 359-366.
- Bort, A. R., E. Sevilla-Romero, M. J. Gamborino, A. Munoz and M. D. Pinazo-Duran (2002). "[A study on developmental characteristics of optic nerve in a rat model of materno-foetal hypothyroidism]." *Arch Soc Esp Oftalmol* 77(2): 73-80.
- Boudina, S., S. Sena, B. T. O'Neill, P. Tathireddy, M. E. Young and E. D. Abel (2005). "Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity." *Circulation* 112(17): 2686-2695.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brand, M. D. and M. P. Murphy (1987). "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells." *Biol Rev Camb Philos Soc* 62(2): 141-193.
- Brand, M. D., D. Steverding, B. Kadenbach, P. M. Stevenson and R. P. Hafner (1992). "The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones." *Eur J Biochem* 206(3): 775-781.
- Braun, D., A. Kinne, A. U. Bräuer, R. Sapin, M. O. Klein, J. Köhrle, E. K. Wirth and U. Schweizer (2011a). "Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and in primary brain cells." *Glia* 59(3): 463-471.
- Braun, D., I. Lelios, G. Krause and U. Schweizer (2013). "Histidines in potential substrate recognition sites affect thyroid hormone transport by monocarboxylate transporter 8 (MCT8)." *Endocrinology* 154(7): 2553-2561.
- Braun, D., E. K. Wirth, F. Wohlgemuth, N. Reix, M. O. Klein, A. Grütters, J. Köhrle and U. Schweizer (2011b). "Aminoaciduria, but normal thyroid hormone levels and signalling, in mice lacking the amino acid and thyroid hormone transporter Slc7a8." *Biochem J* 439(2): 249-255.
- Broer, S. and N. Brookes (2001). "Transfer of glutamine between astrocytes and neurons." *J Neurochem* 77(3): 705-719.
- Bushong, E. A., M. E. Martone, Y. Z. Jones and M. H. Ellisman (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains." *J Neurosci* 22(1): 183-192.
- Cahoy, J. D., B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. A. Krieg, S. A. Krupenko, W. J. Thompson and B. A. Barres (2008a). "A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(1): 264-278.
- Cahoy, J. D., B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. A. Krieg, S. A. Krupenko, W. J. Thompson and B. A. Barres (2008b). "A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function." *J Neurosci* 28(1): 264-278.
- Cao, Z., C. West, C. S. Norton-Wenzel, R. Rej, F. B. Davis, P. J. Davis and R. Rej (2009). "Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum." *Endocr Res* 34(4): 101-108.
- Casanova, E., S. Fehsenfeld, T. Mantamadiotis, T. Lemberger, E. Greiner, A. F. Stewart and G. Schutz (2001). "A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation." *Genesis* 31(1): 37-42.
- Casas, F., P. Rochard, A. Rodier, I. Cassar-Malek, S. Marchal-Victorion, R. J. Wiesner, G. Cabello and C. Wrutniak (1999). "A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbAalpha1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis." *Mol Cell Biol* 19(12): 7913-7924.
- Cerdan, S., B. Kunnecke and J. Seelig (1990). "Cerebral metabolism of [1,2-13C2]acetate as detected by in vivo and in vitro 13C NMR." *J Biol Chem* 265(22): 12916-12926.
- Chan, S. Y., A. Martin-Santos, L. S. Loubiere, A. M. Gonzalez, B. Stieger, A. Logan, C. J. McCabe, J. A. Franklyn and M. D. Kilby (2011). "The expression of thyroid hormone transporters in the human fetal cerebral cortex during early development and in N-Tera-2 neurodifferentiation." *J Physiol* 589(Pt 11): 2827-2845.
- Chapa, F., B. Kunnecke, R. Calvo, F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar and S. Cerdan (1995). "Adult-onset hypothyroidism and the cerebral metabolism of (1,2-13C2) acetate

- as detected by ^{13}C nuclear magnetic resonance." *Endocrinology* 136(1): 296-305.
- Chatonnet, F., F. Flamant and B. Morte (2015). "A temporary compendium of thyroid hormone target genes in brain." *Biochim Biophys Acta* 1849(2): 122-129.
- Cheng, S. Y., J. L. Leonard and P. J. Davis (2010). "Molecular aspects of thyroid hormone actions." *Endocr Rev* 31(2): 139-170.
- Chomczynski, P. and M. Rymaszewski (2006). "Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood." *Biotechniques* 40(4): 454, 456, 458.
- Davis, P. J., F. B. Davis and V. Cody (2005). "Membrane receptors mediating thyroid hormone action." *Trends Endocrinol Metab* 16(9): 429-435.
- De Deken, X., D. Wang, M. C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J. E. Dumont and F. Miot (2000). "Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family." *J Biol Chem* 275(30): 23227-23233.
- de Graaf, R. A., G. F. Mason, A. B. Patel, K. L. Behar and D. L. Rothman (2003). "In vivo ^1H - ^{13}C -NMR spectroscopy of cerebral metabolism." *NMR Biomed* 16(6-7): 339-357.
- Di Cosmo, C., X. H. Liao, A. M. Dumitrescu, R. E. Weiss and S. Refetoff (2009). "A thyroid hormone analog with reduced dependence on the monocarboxylate transporter 8 for tissue transport." *Endocrinology* 150(9): 4450-4458.
- Dickson, P. W., A. R. Aldred, J. G. Menting, P. D. Marley, W. H. Sawyer and G. Schreiber (1987). "Thyroxine transport in choroid plexus." *J Biol Chem* 262(29): 13907-13915.
- Dohan, O., A. De la Vieja, V. Paroder, C. Riedel, M. Artani, M. Reed, C. S. Ginter and N. Carrasco (2003). "The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance." *Endocr Rev* 24(1): 48-77.
- Dorsa, K. K., M. V. Santos and M. R. Silva (2010). "Enhancing T3 and cAMP responsive gene participation in the thermogenic regulation of fuel oxidation pathways." *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54(4): 381-389.
- Dossena, S., C. Nofziger, G. Tamma, E. Bernardinelli, S. Vanoni, C. Nowak, E. Grabmayer, S. Kossler, S. Stephan, W. Patsch and M. Paulmichl (2011). "Molecular and functional characterization of human pendrin and its allelic variants." *Cell Physiol Biochem* 28(3): 451-466.
- Dumitrescu, A. M., X. H. Liao, T. B. Best, K. Brockmann and S. Refetoff (2004). "A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene." *Am J Hum Genet* 74(1): 168-175.
- Dumitrescu, A. M., X. H. Liao, R. E. Weiss, K. Millen and S. Refetoff (2006). "Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice." *Endocrinology* 147(9): 4036-4043.
- Eckel, J., G. S. Rao, M. L. Rao and H. Breuer (1979). "Uptake of L-tri-iodothyronine by isolated rat liver cells. A process partially inhibited by metabolic inhibitors; attempts to distinguish between uptake and binding to intracellular proteins." *Biochem J* 182(2): 473-491.
- Fearnley, J. M. and A. J. Lees (1991). "Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity." *Brain* 114 (Pt 5): 2283-2301.
- Ferrara, A. M., X. H. Liao, P. Gil-Ibanez, T. Marcinkowski, J. Bernal, R. E. Weiss, A. M. Dumitrescu and S. Refetoff (2013). "Changes in thyroid status during perinatal development of MCT8-deficient male mice." *Endocrinology* 154(7): 2533-2541.
- Forrest, D., L. C. Erway, L. Ng, R. Altschuler and T. Curran (1996). "Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function." *Nat Genet* 13(3): 354-357.
- Freinkel, N., S. H. Ingbar and J. T. Dowling (1957). "The influence of extracellular thyroxine-binding protein upon the accumulation of thyroxine by tissue slices." *J Clin Invest* 36(1 Part 1): 25-37.
- Friedrichs, B., C. Tepel, T. Reinheckel, J. Deussing, K. von Figura, V. Herzog, C. Peters, P.

- Saftig and K. Brix (2003). "Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L." *J Clin Invest* 111(11): 1733-1745.
- Friesema, E. C., S. Ganguly, A. Abdalla, J. E. Manning Fox, A. P. Halestrap and T. J. Visser (2003). "Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter." *J Biol Chem* 278(41): 40128-40135.
- Friesema, E. C., A. Grueters, H. Biebermann, H. Krude, A. von Moers, M. Reeser, T. G. Barrett, E. E. Mancilla, J. Svensson, M. H. Kester, G. G. Kuiper, S. Balkassmi, A. G. Uitterlinden, J. Koehrle, P. Rodien, A. P. Halestrap and T. J. Visser (2004). "Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation." *Lancet* 364(9443): 1435-1437.
- Friesema, E. C., J. Jansen, H. Heuer, M. Trajkovic, K. Bauer and T. J. Visser (2006). "Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2(9): 512-523.
- Friesema, E. C., J. Jansen, J. W. Jachtenberg, W. E. Visser, M. H. Kester and T. J. Visser (2008). "Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10." *Mol Endocrinol* 22(6): 1357-1369.
- Friesema, E. C., T. J. Visser, A. J. Borgers, A. Kalsbeek, D. F. Swaab, E. Fliers and A. Alkemade (2012). "Thyroid hormone transporters and deiodinases in the developing human hypothalamus." *Eur J Endocrinol* 167(3): 379-386.
- Galton, V. A., E. T. Wood, E. A. St Germain, C. A. Withrow, G. Aldrich, G. M. St Germain, A. S. Clark and D. L. St Germain (2007). "Thyroid Hormone Homeostasis and Action in the Type 2 Deiodinase-Deficient Rodent Brain During Development." *Endocrinology*.
- Garstka, H. L., W. E. Schmitt, J. Schultz, B. Sogl, B. Silakowski, A. Perez-Martos, J. Montoya and R. J. Wiesner (2003). "Import of mitochondrial transcription factor A (TFAM) into rat liver mitochondria stimulates transcription of mitochondrial DNA." *Nucleic Acids Res* 31(17): 5039-5047.
- Gilbert, M. E., L. Sui, M. J. Walker, W. Anderson, S. Thomas, S. N. Smoller, J. P. Schon, S. Phani and J. H. Goodman (2007). "Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus." *Endocrinology* 148(1): 92-102.
- Gnidehou, S., B. Caillou, M. Talbot, R. Ohayon, J. Kaniewski, M. S. Noel-Hudson, S. Morand, D. Agnangji, A. Sezan, F. Courtin, A. Virion and C. Dupuy (2004). "Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site." *FASEB J* 18(13): 1574-1576.
- Groeneweg, S., E. C. Friesema, S. Kersseboom, W. Klootwijk, W. E. Visser, R. P. Peeters and T. J. Visser (2014). "The role of Arg445 and Asp498 in the human thyroid hormone transporter MCT8." *Endocrinology* 155(2): 618-626.
- Groeneweg, S., E. C. Lima de Souza, W. E. Visser, R. P. Peeters and T. J. Visser (2013). "Importance of His192 in the human thyroid hormone transporter MCT8 for substrate recognition." *Endocrinology* 154(7): 2525-2532.
- Gruetter, R., E. R. Seaquist and K. Ugurbil (2001). "A mathematical model of compartmentalized neurotransmitter metabolism in the human brain." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(1): E100-112.
- Guadano Ferraz, A., F. Escobar del Rey, G. Morreale de Escobar, G. M. Innocenti and P. Berbel (1994). "The development of the anterior commissure in normal and hypothyroid rats." *Brain Res Dev Brain Res* 81(2): 293-308.
- Gupta, R. K., V. Bhatia, H. Poptani and R. B. Gujral (1995). "Brain metabolite changes on in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in children with congenital hypothyroidism." *J Pediatr* 126(3): 389-392.

- Halassa, M. M., T. Fellin, H. Takano, J. H. Dong and P. G. Haydon (2007). "Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte." *J Neurosci* 27(24): 6473-6477.
- Harington, C. R. and G. Barger (1927). "Chemistry of Thyroxine: Constitution and Synthesis of Thyroxine." *Biochem J* 21(1): 169-183.
- Harsan, L. A., J. Steibel, A. Zaremba, A. Agin, R. Sapin, P. Poulet, B. Guignard, N. Parizel, D. Grucker, N. Boehm, R. H. Miller and M. S. Ghandour (2008). "Recovery from chronic demyelination by thyroid hormone therapy: myelinogenesis induction and assessment by diffusion tensor magnetic resonance imaging." *J Neurosci* 28(52): 14189-14201.
- Hennemann, G., R. Docter, E. C. Friesema, M. de Jong, E. P. Krenning and T. J. Visser (2001). "Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability." *Endocr Rev* 22(4): 451-476.
- Heuer, H. and C. A. Mason (2003). "Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor $\alpha 1$." *J Neurosci* 23(33): 10604-10612.
- Hoch, F. L. (1988). "Lipids and thyroid hormones." *Prog Lipid Res* 27(3): 199-270.
- Hoefig, C. S., S. F. Jacobi, A. Warner, L. Harder, N. Schanze, B. Vennstrom and J. Mittag (2015). "3-Iodothyroacetic acid lacks thermoregulatory and cardiovascular effects in vivo." *Br J Pharmacol* 172(13): 3426-3433.
- Horn, S., S. Kersseboom, S. Mayerl, J. Muller, C. Groba, M. Trajkovic-Arsic, T. Ackermann, T. J. Visser and H. Heuer (2013). "Tetrac can replace thyroid hormone during brain development in mouse mutants deficient in the thyroid hormone transporter mct8." *Endocrinology* 154(2): 968-979.
- Horst, C., H. Rokos and H. J. Seitz (1989). "Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-di-iodo-L-thyronine." *Biochem J* 261(3): 945-950.
- Horvath, T. L., C. H. Warden, M. Hajos, A. Lombardi, F. Goglia and S. Diano (1999). "Brain uncoupling protein 2: uncoupled neuronal mitochondria predict thermal synapses in homeostatic centers." *J Neurosci* 19(23): 10417-10427.
- Iglesias, T., J. Caubin, A. Zaballos, J. Bernal and A. Munoz (1995). "Identification of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3) as a thyroid hormone regulated gene by whole genome PCR analysis." *Biochem Biophys Res Commun* 210(3): 995-1000.
- James, S. R., J. A. Franklyn, B. J. Reaves, V. E. Smith, S. Y. Chan, T. G. Barrett, M. D. Kilby and C. J. McCabe (2009). "Monocarboxylate transporter 8 in neuronal cell growth." *Endocrinology* 150(4): 1961-1969.
- Jayarama-Naidu, R., J. Johannes, F. Meyer, E. K. Wirth, L. Schomburg, J. Köhrle and K. Renko (2015). "A Nonradioactive Uptake Assay for Rapid Analysis of Thyroid Hormone Transporter Function." *Endocrinology* 156(7): 2739-2745.
- Johannes, J., D. Braun, A. Kinne, D. Rathmann, J. Köhrle and U. Schweizer (2016). "Few Amino Acid Exchanges Expand the Substrate Spectrum of Monocarboxylate Transporter 10." *Mol Endocrinol* 30(7): 796-808.
- Jones, S. A., D. M. Jolson, K. K. Cuta, C. N. Mariash and G. W. Anderson (2003). "Triiodothyronine is a survival factor for developing oligodendrocytes." *Mol Cell Endocrinol* 199(1-2): 49-60.
- Kallo, I., P. Mohacsik, B. Vida, A. Zeold, Z. Bardoczi, A. M. Zavacki, E. Farkas, A. Kadar, E. Hrabovszky, E. D. R. Arrojo, L. Dong, L. Barna, M. Palkovits, B. A. Borsay, L. Herczeg, R. M. Lechan, A. C. Bianco, Z. Liposits, C. Fekete and B. Gereben (2012). "A novel pathway regulates thyroid hormone availability in rat and human hypothalamic neurosecretory neurons." *PLoS One* 7(6): e37860.
- Kasischke, K. A. (2008). "A new pathway for lactate production in the CNS." *J Physiol* 586(Pt 5): 1207-1208.
- Kendall, E. C. (1964). "Reminiscences on the Isolation of Thyroxine." *Mayo Clin Proc* 39: 548-

- 552.
- Kim, D. K., Y. Kanai, H. Matsuo, J. Y. Kim, A. Chairoungdua, Y. Kobayashi, A. Enomoto, S. H. Cha, T. Goya and H. Endou (2002). "The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location." *Genomics* 79(1): 95-103.
- Kinne, A., G. Kleinau, C. S. Hoefig, A. Grüters, J. Köhrle, G. Krause and U. Schweizer (2010). "Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8." *J Biol Chem* 285(36): 28054-28063.
- Kinne, A., S. Roth, H. Biebermann, J. Köhrle, A. Grüters and U. Schweizer (2009). "Surface translocation and tri-iodothyronine uptake of mutant MCT8 proteins are cell type-dependent." *J Mol Endocrinol* 43(6): 263-271.
- Kinne, A., M. Wittner, E. K. Wirth, K. M. Hinz, R. Schulein, J. Köhrle and G. Krause (2015). "Involvement of the L-Type Amino Acid Transporter Lat2 in the Transport of 3,3'-Diiodothyronine across the Plasma Membrane." *Eur Thyroid J* 4(Suppl 1): 42-50.
- Köhrle, J. (2002). "Iodothyronine deiodinases." *Methods in enzymology* 347: 125-167.
- Koibuchi, N., S. Matsuzaki, K. Ichimura, H. Ohtake and S. Yamaoka (1996). "Ontogenic changes in the expression of cytochrome c oxidase subunit I gene in the cerebellar cortex of the perinatal hypothyroid rat." *Endocrinology* 137(11): 5096-5108.
- Krenning, E. P., R. Docter, H. F. Bernard, T. J. Visser and G. Hennemann (1978). "Active transport of triiodothyronine (T3) into isolated rat liver cells." *FEBS Lett* 91(1): 113-116.
- Lafreniere, R. G., L. Carrel and H. F. Willard (1994). "A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2." *Hum Mol Genet* 3(7): 1133-1139.
- Lanni, A., M. Moreno, A. Lombardi and F. Goglia (1994). "Rapid stimulation in vitro of rat liver cytochrome oxidase activity by 3,5-diiodo-L-thyronine and by 3,3'-diiodo-L-thyronine." *Mol Cell Endocrinol* 99(1): 89-94.
- Lanni, A., M. Moreno, A. Lombardi and F. Goglia (2003). "Thyroid hormone and uncoupling proteins." *FEBS Lett* 543(1-3): 5-10.
- Larsen, S., J. Nielsen, C. N. Hansen, L. B. Nielsen, F. Wibrand, N. Stride, H. D. Schroder, R. Boushel, J. W. Helge, F. Dela and M. Hey-Mogensen (2012). "Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects." *J Physiol* 590(Pt 14): 3349-3360.
- Laudet, V. (2011). "The origins and evolution of vertebrate metamorphosis." *Curr Biol* 21(18): R726-737.
- Lee, F. J., L. Pei, A. Moszczynska, B. Vukusic, P. J. Fletcher and F. Liu (2007). "Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor." *EMBO J* 26(8): 2127-2136.
- Li, R., K. Luciakova, A. Zaid, S. Betina, E. Fridell and B. D. Nelson (1997). "Thyroid hormone activates transcription from the promoter regions of some human nuclear-encoded genes of the oxidative phosphorylation system." *Mol Cell Endocrinol* 128(1-2): 69-75.
- Liao, X. H., C. Di Cosmo, A. M. Dumitrescu, A. Hernandez, J. Van Sande, D. L. St Germain, R. E. Weiss, V. A. Galton and S. Refetoff (2011). "Distinct roles of deiodinases on the phenotype of Mct8 defect: a comparison of eight different mouse genotypes." *Endocrinology* 152(3): 1180-1191.
- Lopez-Espindola, D., C. Morales-Bastos, C. Grijota-Martinez, X. H. Liao, D. Lev, E. Sugo, C. F. Verge, S. Refetoff, J. Bernal and A. Guadano-Ferraz (2014). "Mutations of the thyroid hormone transporter MCT8 cause prenatal brain damage and persistent hypomyelination." *J Clin Endocrinol Metab* 99(12): E2799-2804.
- Magnus-Levy, A. (1895). "Ueber den respiratorischen Gaswechsel unter dem Einfluss der Thyroidea sowie unter verschiedenen pathologischen Zuständen." *Berlin Klin Wochenschr* 32: 650-652.

- Marek, K. L., J. P. Seibyl, S. S. Zoghbi, Y. Zea-Ponce, R. M. Baldwin, B. Fussell, D. S. Charney, C. van Dyck, P. B. Hoffer and R. P. Innis (1996). "[123I] beta-CIT/SPECT imaging demonstrates bilateral loss of dopamine transporters in hemi-Parkinson's disease." *Neurology* 46(1): 231-237.
- Martinez, B., P. del Hoyo, M. A. Martin, J. Arenas, A. Perez-Castillo and A. Santos (2001). "Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats." *J Neurochem* 78(5): 1054-1063.
- Martinez, B., T. B. Rodrigues, E. Gine, J. P. Kaninda, A. Perez-Castillo and A. Santos (2009). "Hypothyroidism decreases the biogenesis in free mitochondria and neuronal oxygen consumption in the cerebral cortex of developing rats." *Endocrinology* 150(8): 3953-3959.
- Martinez, R. and F. C. Gomes (2005). "Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway." *J Neurosci Res* 80(3): 341-349.
- Mason, G. F. and D. L. Rothman (2004). "Basic principles of metabolic modeling of NMR (13)C isotopic turnover to determine rates of brain metabolism in vivo." *Metab Eng* 6(1): 75-84.
- Mayerl, S., J. Müller, R. Bauer, S. Richert, C. M. Kassmann, V. M. Darras, K. Buder, A. Boelen, T. J. Visser and H. Heuer (2014). "Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis." *J Clin Invest* 124(5): 1987-1999.
- McCaslin, A. F., B. R. Chen, A. J. Radosevich, B. Cauli and E. M. Hillman (2011). "In vivo 3D morphology of astrocyte-vasculature interactions in the somatosensory cortex: implications for neurovascular coupling." *J Cereb Blood Flow Metab* 31(3): 795-806.
- Melone, M., H. Varoqui, J. D. Erickson and F. Conti (2006). "Localization of the Na(+)-coupled neutral amino acid transporter 2 in the cerebral cortex." *Neuroscience* 140(1): 281-292.
- Minelli, A., S. DeBiasi, N. C. Brecha, L. V. Zuccarello and F. Conti (1996). "GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex." *J Neurosci* 16(19): 6255-6264.
- Moeller, L. C. and M. Broecker-Preuss (2011a). "Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone." *Thyroid Res* 4 Suppl 1: S6.
- Moeller, L. C. and M. Broecker-Preuss (2011b). "Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone." *Thyroid research* 4 Suppl 1: S6.
- Morte, B. and J. Bernal (2014). "Thyroid hormone action: astrocyte-neuron communication." *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 82.
- Morte, B., A. Ceballos, D. Diez, C. Grijota-Martinez, A. M. Dumitrescu, C. Di Cosmo, V. A. Galton, S. Refetoff and J. Bernal (2010). "Thyroid hormone-regulated mouse cerebral cortex genes are differentially dependent on the source of the hormone: a study in monocarboxylate transporter-8- and deiodinase-2-deficient mice." *Endocrinology* 151(5): 2381-2387.
- Mosconi, L., A. Pupi and M. J. De Leon (2008). "Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* 1147: 180-195.
- Mullen, R. J., C. R. Buck and A. M. Smith (1992). "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates." *Development* 116(1): 201-211.
- Müller, J., S. Mayerl, T. J. Visser, V. M. Darras, A. Boelen, L. Frappart, L. Mariotta, F. Verrey and H. Heuer (2014). "Tissue-specific alterations in thyroid hormone homeostasis in combined Mct10 and Mct8 deficiency." *Endocrinology* 155(1): 315-325.
- Nunez, B., R. Martinez de Mena, M. J. Obregon, M. Font-Llitjos, V. Nunes, M. Palacin, A. M. Dumitrescu, B. Morte and J. Bernal (2014). "Cerebral cortex hyperthyroidism of

- newborn mct8-deficient mice transiently suppressed by lat2 inactivation." *PLoS One* 9(5): e96915.
- Nyfeler, B., V. Reiterer, M. W. Wendeler, E. Stefan, B. Zhang, S. W. Michnick and H. P. Hauri (2008). "Identification of ERGIC-53 as an intracellular transport receptor of alpha1-antitrypsin." *J Cell Biol* 180(4): 705-712.
- O'Reilly, I. and M. P. Murphy (1992). "Studies on the rapid stimulation of mitochondrial respiration by thyroid hormones." *Acta Endocrinol (Copenh)* 127(6): 542-546.
- Palha, J. A., V. Episkopou, S. Maeda, K. Shimada, M. E. Gottesman and M. J. Saraiva (1994). "Thyroid hormone metabolism in a transthyretin-null mouse strain." *J Biol Chem* 269(52): 33135-33139.
- Palha, J. A., R. Fernandes, G. M. de Escobar, V. Episkopou, M. Gottesman and M. J. Saraiva (2000). "Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model." *Endocrinology* 141(9): 3267-3272.
- Palha, J. A., M. T. Hays, G. Morreale de Escobar, V. Episkopou, M. E. Gottesman and M. J. Saraiva (1997). "Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice." *Am J Physiol* 272(3 Pt 1): E485-493.
- Pellerin, L. and P. J. Magistretti (1994). "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10625-10629.
- Pellerin, L., G. Pellegrini, P. G. Bittar, Y. Charnay, C. Bouras, J. L. Martin, N. Stella and P. J. Magistretti (1998). "Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle." *Dev Neurosci* 20(4-5): 291-299.
- Provencher, S. W. (1993). "Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra." *Magn Reson Med* 30(6): 672-679.
- Rathmann, D., E. Rijntjes, J. Lietzow and J. Köhrle (2015). "Quantitative Analysis of Thyroid Hormone Metabolites in Cell Culture Samples Using LC-MS/MS." *Eur Thyroid J* 4(Suppl 1): 51-58.
- Riese, C., M. Michaelis, B. Mentrup, F. Gotz, J. Köhrle, U. Schweizer and L. Schomburg (2006). "Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues." *Endocrinology* 147(12): 5883-5892.
- Robbins, J. and J. E. Rall (1960). "Proteins associated with the thyroid hormones." *Physiol Rev* 40: 415-489.
- Roberts, L. M., K. Woodford, M. Zhou, D. S. Black, J. E. Haggerty, E. H. Tate, K. K. Grindstaff, W. Mengesha, C. Raman and N. Zerangue (2008). "Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier." *Endocrinology* 149(12): 6251-6261.
- Rodrigues, T. B., A. Ceballos, C. Grijota-Martinez, B. Nunez, S. Refetoff, S. Cerdan, B. Morte and J. Bernal (2013a). "Increased oxidative metabolism and neurotransmitter cycling in the brain of mice lacking the thyroid hormone transporter SLC16A2 (MCT8)." *PLoS One* 8(10): e74621.
- Rodrigues, T. B., J. Valette and A. K. Bouzier-Sore (2013b). "(13)C NMR spectroscopy applications to brain energy metabolism." *Front Neuroenergetics* 5: 9.
- Roth, S., S. Zhang, J. Chiu, E. K. Wirth and U. Schweizer (2010a). "Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin E in neuronal survival." *J Trace Elem Med Biol* 24(2): 130-137.
- Roth, S., S. Zhang, J. Chiu, E. K. Wirth and U. Schweizer (2010b). "Development of a serum-free supplement for primary neuron culture reveals the interplay of selenium and vitamin

- E in neuronal survival." *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* 24(2): 130-137.
- Royaux, I. E., K. Suzuki, A. Mori, R. Katoh, L. A. Everett, L. D. Kohn and E. D. Green (2000). "Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells." *Endocrinology* 141(2): 839-845.
- Scanlan, T. S., K. L. Suchland, M. E. Hart, G. Chiellini, Y. Huang, P. J. Kruzich, S. Frascarelli, D. A. Crossley, J. R. Bunzow, S. Ronca-Testoni, E. T. Lin, D. Hatton, R. Zucchi and D. K. Grandy (2004). "3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone." *Nature medicine* 10(6): 638-642.
- Schmohl, K. A., A. M. Muller, N. Schwenk, K. Knoop, E. Rijntjes, J. Köhrle, H. Heuer, P. Bartenstein, B. Goke, P. J. Nelson and C. Spitzweg (2015). "Establishment of an Effective Radioiodide Thyroid Ablation Protocol in Mice." *Eur Thyroid J* 4(Suppl 1): 74-80.
- Schneider, M. J. and V. A. Galton (1995). "Effect of glucocorticoids on thyroid hormone action in cultured red blood cells from *Rana catesbeiana* tadpoles." *Endocrinology* 136(4): 1435-1440.
- Schreiber, G., A. R. Aldred, A. Jaworowski, C. Nilsson, M. G. Achen and M. B. Segal (1990). "Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus." *Am J Physiol* 258(2 Pt 2): R338-345.
- Schwartz, C. E., M. M. May, N. J. Carpenter, R. C. Rogers, J. Martin, M. G. Bialer, J. Ward, J. Sanabria, S. Marsa, J. A. Lewis, R. Echeverri, H. A. Lubs, K. Voeller, R. J. Simensen and R. E. Stevenson (2005). "Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene." *Am J Hum Genet* 77(1): 41-53.
- Schwartz, C. E. and R. E. Stevenson (2007). "The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21(2): 307-321.
- Schweizer, U., J. Johannes, D. Bayer and D. Braun (2014). "Structure and function of thyroid hormone plasma membrane transporters." *Eur Thyroid J* 3(3): 143-153.
- Schweizer, U. and J. Köhrle (2013). "Function of thyroid hormone transporters in the central nervous system." *Biochim Biophys Acta* 1830(7): 3965-3973.
- Sijens, P. E., L. A. Rodiger, L. C. Meiners and R. J. Lunsing (2008). "1H magnetic resonance spectroscopy in monocarboxylate transporter 8 gene deficiency." *J Clin Endocrinol Metab* 93(5): 1854-1859.
- Sinha, R. A., A. Pathak, V. Mohan, S. Babu, A. Pal, D. Khare and M. M. Godbole (2010). "Evidence of a bigenomic regulation of mitochondrial gene expression by thyroid hormone during rat brain development." *Biochem Biophys Res Commun* 397(3): 548-552.
- Somjen, D., F. Ismail-Beigi and I. S. Edelman (1981). "Nuclear binding of T3 and effects of QO2, Na-K-ATPase, and alpha-GPDH in liver and kidney." *Am J Physiol* 240(2): E146-154.
- Souza, P. C., A. C. Puhl, L. Martinez, R. Aparicio, A. S. Nascimento, A. C. Figueira, P. Nguyen, P. Webb, M. S. Skaf and I. Polikarpov (2014). "Identification of a new hormone-binding site on the surface of thyroid hormone receptor." *Mol Endocrinol* 28(4): 534-545.
- Spitzweg, C. and J. C. Morris (2010). "Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to NIS mutations." *Mol Cell Endocrinol* 322(1-2): 56-63.
- Stobart, J. L. and C. M. Anderson (2013). "Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply." *Front Cell Neurosci* 7: 38.
- Taurog, A., M. L. Dorris and D. R. Doerge (1996). "Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase." *Arch Biochem Biophys* 330(1): 24-32.

- Thompson, C. C. and G. B. Potter (2000). "Thyroid hormone action in neural development." *Cereb Cortex* 10(10): 939-945.
- Trajkovic-Arsic, M., T. J. Visser, V. M. Darras, E. C. Friesema, B. Schlott, J. Mittag, K. Bauer and H. Heuer (2010). "Consequences of monocarboxylate transporter 8 deficiency for renal transport and metabolism of thyroid hormones in mice." *Endocrinology* 151(2): 802-809.
- Trajkovic, M., T. J. Visser, J. Mittag, S. Horn, J. Lukas, V. M. Darras, G. Raivich, K. Bauer and H. Heuer (2007). "Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8." *J Clin Invest* 117(3): 627-635.
- Trentin, A. G., C. B. De Aguiar, R. C. Garcez and M. Alvarez-Silva (2003). "Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion." *Glia* 42(4): 359-369.
- Trentin, A. G. and V. Moura Neto (1995). "T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization." *Neuroreport* 6(2): 293-296.
- van der Deure, W., R. Peeters and T. Visser (2009). "Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10 and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters." *J Mol Endocrinol*.
- van der Deure, W. M., R. P. Peeters and T. J. Visser (2010). "Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters." *Journal of molecular endocrinology* 44(1): 1-11.
- van Doorn, J., F. Roelfsema and D. van der Heide (1985). "Concentrations of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine at 34 different sites in euthyroid rats as determined by an isotopic equilibrium technique." *Endocrinology* 117(3): 1201-1208.
- Vega-Nunez, E., A. Menendez-Hurtado, R. Garesse, A. Santos and A. Perez-Castillo (1995). "Thyroid hormone-regulated brain mitochondrial genes revealed by differential cDNA cloning." *J Clin Invest* 96(2): 893-899.
- Verge, C. F., D. Konrad, M. Cohen, C. Di Cosmo, A. M. Dumitrescu, T. Marcinkowski, S. Hameed, J. Hamilton, R. E. Weiss and S. Refetoff (2012). "Diiodothyropropionic acid (DITPA) in the treatment of MCT8 deficiency." *J Clin Endocrinol Metab* 97(12): 4515-4523.
- Visser, W. E., E. C. Friesema and T. J. Visser (2011). "Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns." *Molecular endocrinology* 25(1): 1-14.
- Visser, W. E., J. Jansen, E. C. Friesema, M. H. Kester, E. Mancilla, J. Lundgren, M. S. van der Knaap, R. J. Lunsing, O. F. Brouwer and T. J. Visser (2009a). "Novel pathogenic mechanism suggested by ex vivo analysis of MCT8 (SLC16A2) mutations." *Hum Mutat* 30(1): 29-38.
- Visser, W. E., N. J. Philp, T. B. van Dijk, W. Klootwijk, E. C. Friesema, J. Jansen, P. W. Beesley, A. G. Ianculescu and T. J. Visser (2009b). "Evidence for a homodimeric structure of human monocarboxylate transporter 8." *Endocrinology* 150(11): 5163-5170.
- Visser, W. E., P. Vrijmoeth, F. E. Visser, W. F. Arts, H. van Toor and T. J. Visser (2013). "Identification, functional analysis, prevalence and treatment of monocarboxylate transporter 8 (MCT8) mutations in a cohort of adult patients with mental retardation." *Clin Endocrinol (Oxf)* 78(2): 310-315.
- Weitzel, J. M., C. Radtke and H. J. Seitz (2001). "Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat." *Nucleic Acids Res* 29(24): 5148-5155.
- Wemeau, J. L., M. Pigeyre, E. Proust-Lemoine, M. d'Herbomez, F. Gottrand, J. Jansen, T. J. Visser and M. Ladsous (2008). "Beneficial effects of propylthiouracil plus L-thyroxine treatment in a patient with a mutation in MCT8." *J Clin Endocrinol Metab* 93(6): 2084-2088.

- Williams, G. R. and J. H. Bassett (2011). "Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase." *J Endocrinol* 209(3): 261-272.
- Wilson, M. C., D. Meredith and A. P. Halestrap (2002). "Fluorescence resonance energy transfer studies on the interaction between the lactate transporter MCT1 and CD147 provide information on the topology and stoichiometry of the complex in situ." *J Biol Chem* 277(5): 3666-3672.
- Wirth, E. K., E. Rijntjes, F. Meyer, J. Köhrle and U. Schweizer (2015). "High T3, Low T4 Serum Levels in Mct8 Deficiency Are Not Caused by Increased Hepatic Conversion through Type I Deiodinase." *Eur Thyroid J* 4(Suppl 1): 87-91.
- Wirth, E. K., S. Roth, C. Blechschmidt, S. M. Hölter, L. Becker, I. Racz, A. Zimmer, T. Klopstock, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, W. Wurst, T. Naumann, A. Bräuer, M. Hrabě de Angelis, J. Köhrle, A. Grüters and U. Schweizer (2009). "Neuronal 3',3',5'-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome." *J Neurosci* 29(30): 9439-9449.
- Wirth, E. K., S. Y. Sheu, J. Chiu-Ugalde, R. Sapin, M. O. Klein, I. Mossbrugger, L. Quintanilla-Martinez, M. Hrabě de Angelis, H. Krude, T. Riebel, K. Rothe, J. Köhrle, K. W. Schmid, U. Schweizer and A. Grüters (2011). "Monocarboxylate transporter 8 deficiency: altered thyroid morphology and persistent high triiodothyronine/thyroxine ratio after thyroidectomy." *Eur J Endocrinol* 165(4): 555-561.
- Wood, W. J., T. Geraci, A. Nilsen, A. E. DeBarber and T. S. Scanlan (2009). "Iodothyronamines are oxidatively deaminated to iodothyroacetic acids in vivo." *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10(2): 361-365.
- Wrutniak, C., I. Cassar-Malek, S. Marchal, A. Rasclé, S. Heusser, J. M. Keller, J. Flechon, M. Dauca, J. Samarut, J. Ghysdæl and et al. (1995). "A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver." *J Biol Chem* 270(27): 16347-16354.
- Wu, X., T. Kihara, A. Akaike, T. Niidome and H. Sugimoto (2010). "PI3K/Akt/mTOR signaling regulates glutamate transporter 1 in astrocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 393(3): 514-518.
- Zevenbergen, C., M. E. Meima, E. C. Lima de Souza, R. P. Peeters, A. Kinne, G. Krause, W. E. Visser and T. J. Visser (2015). "Transport of Iodothyronines by Human L-Type Amino Acid Transporters." *Endocrinology* 156(11): 4345-4355.
- Zoeller, R. T. and J. Rovet (2004). "Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings." *J Neuroendocrinol* 16(10): 809-818.
- Zonta, M., M. C. Angulo, S. Gobbo, B. Rosengarten, K. A. Hossmann, T. Pozzan and G. Carmignoto (2003). "Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation." *Nat Neurosci* 6(1): 43-50.
- Zwingmann, C., D. Leibfritz and A. S. Hazell (2003). "Energy metabolism in astrocytes and neurons treated with manganese: relation among cell-specific energy failure, glucose metabolism, and intercellular trafficking using multinuclear NMR-spectroscopic analysis." *J Cereb Blood Flow Metab* 23(6): 756-771.

PUBLIKATIONEN

Johannes J, Jayarama-Naidu R, **Meyer F**, Wirth EK, Schweizer U, Schomburg L, Köhrle J, Renko K.

Silychristin, a flavonolignan derived from the milk thistle is a potent inhibitor of the thyroid hormone transporter MCT8.

Endocrinology. 2016 Feb 24;en20151933.

Wirth EK, Rijntjes E, **Meyer F**, Köhrle J, Schweizer U.

High T3, Low T4 Serum Levels in Mct8 Deficiency Are Not Caused by Increased Hepatic Conversion through Type I Deiodinase.

Eur Thyroid J. 2015 Sep;4(Suppl 1):87-91.

Jayarama-Naidu R, Johannes J, **Meyer F**, Wirth EK, Schomburg L, Köhrle J, Renko K.

A Nonradioactive Uptake Assay for Rapid Analysis of Thyroid Hormone Transporter Function.

Endocrinology. 2015 Jul;156(7):2739-45.

DANKSAGUNG

Ein herzliches Dankeschön geht als erstes an meine Projektbetreuerin Dr. Eva K. Wirth für das Überlassen dieses spannenden Promotionsthemas sowie für ihre hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung meiner Dissertation. Dank ihrer fachlichen Kompetenz, anregenden Diskussionen und der Motivation selbst Entscheidungen zu treffen, konnte ich mein Interesse für die Wissenschaft voll und ganz ausleben, was maßgeblich zu meinen eigenen Entwicklungsprozess beitrug.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Ulrich Schweizer als Co-Mentor meines Promotionsprojektes. In zahlreichen Gesprächen kam es, dank seines immensen Wissens, immer wieder zu spannenden Diskussionen, die einen stets zum wissenschaftlichen Weiter- und Umdenken motivierten.

Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle, als Leiter des Instituts für Experimentelle Endokrinologie, danke ich für die Möglichkeit meine Promotion in seinem Institut durchführen zu können.

Prof. Dr. Werner Kloas gilt ein großer Dank für die Betreuung meiner Promotion.

All meinen Arbeitskollegen am Institut danke ich vor allem für die fröhliche, offene und hilfsbereite Weise, die einem in jeglicher Hinsicht entgegengebracht wurde. Besonders danken möchte ich hierbei Anja Fischbach (die nicht nur in fachlichen Fragen immer für mich da war), Antje Kretschmer und Gabriele Böhm für die exzellente Unterstützung bei zahlreichen Experimenten während der gesamten Zeit.

Meinen Mitdoktoranden und Wissenschaftlichen Mitarbeitern danke ich für die tolle kollegiale Stimmung inner- und außerhalb des Labors sowie der Unterstützung bei Problemen, den anregenden Gesprächen und aufmunternden Worten, wenn es mal nicht so rund lief.

Ein großer Dank geht an Prof. Juan Bernal und Prof. Sebastian Cerdan der Universidad Autónoma de Madrid für die spannende Kooperation und der Möglichkeit eines Laboraufenthaltes in deren Institut während meiner Doktorzeit.

Zum Schluss möchte ich den wichtigsten Menschen danken, meiner Familie und vor allem all meinen Freunden, die mir unermüdlich während dieser Zeit zur Seite standen und mich immer wieder in meinem Weg bestärkten.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Zelltyp-spezifische Inaktivierung von *Mct8* im Gehirnzellen: *in vivo* und *in vitro* Analysen des Gehirnstoffwechsels“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Des Weiteren erkläre ich meine Kenntnisnahme der dem angestrebten Abschluss zugrunde liegenden Promotionsordnung. Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe und dass ich nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades bin.

Berlin, den

Franziska Meyer